

編號：CCMP92-RD-117

中藥藥膠布及藥酒製劑之成分分析及其釋出效應之補遺研究（3-3）

黃秀琴

嘉南藥理科技大學 藥學系

摘 要

本計劃延續 90 及 91 年之萬應膏、綠雲膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒處方，制定兩腫藥膠布及藥酒之製造管制標準作業程序（SOP）及化學製造品質管制（CMC）資料。以建立一套完整性之藥膠布及藥酒可依循之品管依據。

關鍵詞：萬應膏、綠雲膏、金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒、SOP、CMC

（本文彩色附圖 10-27，詳見附錄六）

CCMP92-RD-117

Supplement of studies on the component analysis and the effect of release of marker components in patch formulas and tonic wine formulas. (3-3)

Shiow-Chyn Huang

China Nan University of Pharmacy and Science

ABSTRACT

This project continued the previous year 90 and 91 studies to set up standard operating procedure (SOP) and chemical manufacture control (CMC) for two traditional Chinese medicine patches and two tonic wines formulas, namely, Wan-Ying-Kau patch, Lu-Yun-Kau patch, King-Men-Long-Fong wine and Su-Chien-Da-Bu wine.

We expect that these data can be used as the references of quality control for traditional Chinese medicine patches and tonic wines.

Keywords: Wan-Ying-Kau patch, Lu Yun Kau patch, King-Men-Long-Fong wine, Su Chien Da Bu wine, SOP, CMC.

壹、前言

藥膠布為中藥常用於外用消腫、消炎、止痛、生肌、癒合等之外用製劑劑型。市場上藥膠布之種類繁多，品質也參差不齊，主要原因為藥膠布之製法是以麻油浸泡藥材後，再加熱抽取，而以麻油抽取，其有效成分之釋出及以麻油抽取是否適當等等條件，皆是影響藥膠布療效之原因。又對於藥膠布內指標成分之檢驗，僅能檢出後下之一些具揮發性成分，如 methyl salicylate 及 menthol 等成分，藥材之指標成分無法檢出，藥膠布之品質管制即無法建立。

藥酒也是國人喜歡飲用之酒類之一，然而，國產藥酒之酒精濃度皆太高（一般皆在 30% 以上），使得消費對象受到局限，無法普遍性。反觀鄰近之日本，已開發出 14% 酒精濃度之中藥養命酒，其品質安定，適合大眾口味，產值相當大，銷售量逐年上升。另外，國內對於藥酒內藥材及成分之檢驗仍無檢驗標準，因此藥酒之品質管制，也是尚待解決之問題。

基於上述藥膠布及藥酒所遭遇到之瓶頸及問題，本群體計劃 90 及 91 年共開發萬應膏、綠云膏二種中藥藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒二種低酒精濃度（14%）藥酒之成品，並建立此二種藥膠布及二種藥酒處方中各藥材之基原鑑定、指標成分 TLC 及 HPLC 鑑定，藥膠布及藥酒處方製成成品之指標成分 TLC 及 HPLC 之檢驗方法，藥膠布成品經皮吸收試驗及對動物皮膚之各項過敏性毒性試驗及皮膚穿透、止痛、消炎及消腫等藥效評估，及藥酒之製程規格化與貯存安定性及免疫功能評估。本群體計劃之研究成果，將可提供藥廠或相關單位，在藥膠布及藥酒製劑之品質管制及藥效評估之依據及參考。為了能符合衛生署中藥新藥申請臨床試驗所須檢附之化學製造品質管制（CMC）資料，及建立一套完整且能提供給產業界在藥膠布及藥酒製劑的製程及品管之依循方法及檢驗之參考依據，本群體計劃擬再行補充，補足在 90 及 91 年計劃中 CMC 品管檢驗及藥效評估之不足，以完成二種藥膠布及二種藥酒完整之製程、品管檢驗及藥效評估之規範及標準操作程序，提供產業界在中藥藥膠布及藥酒二劑型新藥申請臨床試驗所須檢附之化學製造品質管制（CMC）資料之規範依據。

貳、材料與方法

一、材料

(一) 藥材

由嘉南藥理科技大學統一向國內三家 GMP 藥廠，依下列五種處方內容藥材購買，製作藥膠布及藥酒及分析使用。

1. 萬應膏處方藥材：川烏、草烏、生地黃、白蘞、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、木鱉子等十七味藥材。
2. 綠云膏處方藥材：黃連、大黃、黃芩、黃柏、玄參、木鱉子等六味藥材。
3. 金門龍鳳藥酒處方藥材：五味子 (6.3g/L)、山萸肉 (12.5g/L)、巴戟天 (6.3g/L)、肉蓯蓉 (12.5g/L)、肉桂 (2.5g/L)、當歸 (3.8g/L) 等六味藥材。
4. 十全大補藥酒處方藥材：當歸 (37.5g/L)、川芎 (15.0g/L)、白芍 (22.5g/L)、熟地黃 (30.0g/L)、黨參 (20.0g/L)、茯苓 (30.0g/L)、白朮 (30.0g/L)、甘草 (10.0g/L)、肉桂 (12.5g/L)、黃耆 (22.5g/L) 等十味藥材。

(二) 方法

1. 再製作萬應膏、綠云膏的水性及油性藥膠布各三批

由委託 GMP 藥廠負責，依 90 及 91 年計畫的萬應膏及綠云膏藥膠布製品之製程，再製作二處方的水性及油性藥膠布之半製品（指依處方組成，抽出之浸膏物添加賦形劑，未塗布前之混合物）及每片相同劑量之藥膠布製品（指塗布後之成品）各三批，提供給嘉南藥理科技大學、屏東科技大學及大仁技術學院作相關補充之研究用，並完成萬應膏、綠云膏水性及油性藥膠布之製造管制標準作業程序。

2. 再製作金門龍鳳藥酒及十全大補藥酒各三批

由嘉義大學負責，依 90 及 91 年計劃的金門龍鳳藥酒及十全大補藥酒製程規格，再製作二處方之藥酒半製品（指依處方組成、製程規格浸泡，所得浸泡物）及製品（指浸泡後再經調和、過濾、裝瓶及殺菌之成品）各三批，提供給嘉南藥理科技大學、屏東科技大學及中山大學作相關之研究用，並完成金門龍

鳳藥酒及十全大補藥酒之製造管制標準作業程序。

所採用之步驟如下：

(1) 製作流程：

中藥材原料→細切→熱風乾燥（45～50℃）、24～36 小時。
└→製袋→浸泡（70%酒精、2 個月）→取出藥渣→低溫
貯存→過濾→調和（調整糖度 30⁰Brix 及酒精度 14%）→再過濾→裝
瓶→殺菌→成品

(2) 分析方法⁽¹⁾

1. 可溶性固形物：

以手持屈折糖度計測定，以 ⁰Brix 表示。

2. 酒精度：

採用蒸餾-酒精法（Distillation and hydrometric analysis）。先利用蒸餾方式將酒液中酒精等揮發性成分分離出來，再利用酒精度計讀出蒸餾出之酒液酒精度。

3. 生菌數測定：

取樣品 10ml，依 10 倍數稀釋，再以 Plate counter agar 測定，以 CFU/ml 或 CFU/g 表示。

4. 黴菌菌數之測定：

取樣以含 100ppm chlorotetracycline HCL 及 chloramphenicol 之 Potato Dextrose Agar（PDA）培養基於 25℃ 下培養 1-2 天，計算其菌落數。

5. 大腸桿菌群測定：

以 Lauryl sulfate broth 培養基測試樣品在 37℃ 培養下是否會氣，產氣則判定為陽性反應（+），不產氣則判定為陰性反應（-）。

6. 色度與色調⁽²⁾：

將藥酒成品以 photometer（HITACHI）測定藥酒樣品在波長 420nm 與 520nm 之吸光值。以 A₄₂₀（樣品在波長 420nm 時之吸光值）為指標，色度（I）為 A₄₂₀ 與 A₅₂₀ 之總和，而色調（H）為兩者之比值。

7. 色澤⁽²⁾:

將藥酒成品以色差儀 (Model TC-1500 Dxcolor and color difference meter, Tokyo Denshodu Co., Tokyo, Japan) 測定之, 穿透式標準白板為 X: 93.49, Y: 95.34, Z: 113.21。測定 L, a, b 值, 其中以 L 表示亮度, +a 表示紅色度, -a 表示綠色度, +b 表示黃色度, -b 表示藍色度。

8. 官能品評⁽²⁾:

本試驗將針對外觀及色、香、味進行評分試驗法 (scoring difference test), 由 20 位未經訓練之品評員進行嗜好性品評。評定項目為香氣 (aroma)、顏色 (color)、口感 (taste) 及總體接受性 (overall acceptance)。評分標準以 1 分為極差, 2 分為稍差, 3 分為尚可接受, 4 分為良好, 5 分為最佳。

3. 萬應膏、綠云膏的水性及油性藥膠布半製品及製品 CMC 檢驗

由嘉南藥理科技大學及屏東科技大學負責, 嘉南藥理科技大學負責, 二種藥膠布的水性及油性藥膠布及二種藥酒的半製品及製品之 TLC 指紋圖譜鑑定、及二處方藥酒的半製品及製品之抽取率、總灰分、酸不溶性灰分、水抽提物、稀醇抽提物、含水量、溶劑殘留、重金屬檢驗、微生物限度及微生物污染等項目之檢驗, 其中溶劑殘留、重金屬檢驗、微生物限度及微生物污染等項目, 擬委託莊松榮藥廠代為檢驗。

所採用的步驟如下:

(1) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之 TLC 指紋圖譜

a. 萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布之半製品檢品溶液

由藥廠再製作之萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布各三批半製品, 分別稱取約 80g 於燒杯中, 加 n-Hexane 800ml 加熱溶解萃取, 倒入分液漏斗內, 每次以 EtOH 300ml 作分配萃取, 直至 EtOH 層無色。合併 EtOH 萃取液, 過濾並濃縮至乾, 秤重。將 n-Hexane 層過濾, 得 n-Hexane 層, 濃縮至乾, 秤重。將 n-Hexane 層及 EtOH 層分別以 n-Hexane 及 EtOH 定容至 10ml, 分別為萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布半製品之 n-Hexane 及 EtOH 檢品溶液。

b. 萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布之半製品 TLC 指紋圖譜鑑定取一 10cm x 5cm 之矽膠 TLC 片, 由底部往上 0.7cm 處劃上一橫線, 由左至右分別點上半成品之 n-Hexane 及 EtOH 萃取檢品溶液, 以 CHCl_3 :

MeOH (9:1) 展開溶媒展開，紀錄展開至頂點之距離，風乾 TLC 片，於紫外燈下觀察，並記錄半成品之 n-Hexane 及 EtOH 萃取檢品溶液所呈現色點及 R_f 值，並以照相裝置拍照存檔。

c. 萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布之製品檢品溶液

取藥廠再製作之萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布製品 10 片，將其裁成 1x 1cm 之小片，置入 1000ml 燒杯中，加入 500ml n-hexane 加熱，使膏狀物溶解，倒入分液漏斗內，依 (1) 項 a. 半製品檢品溶液方法萃取，則分別得到萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布之製品檢品溶液。

d. 萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布之製品 TLC 指紋圖譜鑑定

依 (1) 項 b. 萬應膏及綠云膏水性及油性藥膠布之半製品 TLC 指紋圖譜鑑定方法，進行二種藥膠布製品之 TLC 指紋圖譜鑑定。

e. 金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品 TLC 指紋圖譜鑑定

由嘉義大學再製作之金門龍鳳藥酒及十全大補藥酒各三批半製品，濃縮，並定容至 10ml，作為二種藥酒之半製品檢品溶液。

依 (1) 項 b. 萬應膏及綠云膏藥膠布之半製品 TLC 指紋圖譜鑑定方法，進行二種藥酒各三批半製品之 TLC 指紋圖譜鑑定。

f. 金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒製品 TLC 指紋圖譜鑑定

由嘉義大學再製作之金門龍鳳藥酒及十全大補藥酒各三批製品，濃縮，並定容至 10ml，作為二種藥酒之製品檢品溶液。

依 (1) 項 b. 萬應膏及綠云膏藥膠布之半製品 TLC 指紋圖譜鑑定方法，進行二種藥酒各三批製品之 TLC 指紋圖譜鑑定。

(2) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之 HPLC 指紋圖譜

a. 指標成分及內部標準物質

1. 金門龍鳳酒：

五味子：gomisin A、schizandrin 自行單離純化。

山萸肉：loganin 自行單離純化。

肉桂：cinnamic acid, cinnamaldehyde 購自 Fluka。

當歸：scopoletin, ferulic acid 購自 Sigma。

內部標準物質：nobiletin (40 $\mu\text{g/mL}$)。

2. 十全大補藥酒：

當歸、川芎：ferulic acid 自行單離純化。
白芍：paeoniflorin 自行單離純化。
甘草：glycyrrhizin 購自米山藥品。
肉桂：cinnamic acid, cinnamaldehyde 購自 Fluka。
黃耆：calycosin 自行單離純化。
內部標準物質：methylparaben (200 µg/mL)。

3. 萬應膏：

川烏、草烏：aconitine 購自 Sigma。
肉桂：cinnamic acid, cinnamaldehyde 購自 Fluka。
白芷、羌活：isoimperatorin 成功大學吳天賞教授提供。
當歸：ferulic acid 自行單離純化。
赤芍：paeoniflorin 自行單離純化。
甘草：glycyrrhizin 購自米山藥品。
元蓼：harpagoside 購自 Extrasynthese。
大黃：emodin 購自 Sigma, sennoside A、sennoside B 購自 Extrasynthese。
內部標準物質：propylparaben (60 µg/mL)。

4. 綠云膏：

黃連、黃柏：berberine, coptisine 自行單離純化。
大黃：emodin, sennoside A 購自 Extrasynthese。
元蓼：harpagoside 購自 Extrasynthese。
黃芩：baicalin, baicalein 自行單離純化。
內部標準物質：thymol (600 µg/mL)。

b. 試藥及溶媒

95% Ethanol (公賣局)、超純水 (18MΩ, Millipore)、Acetonitrile (LC 級)、Methanol (LC 級)、Phosphoric acid (特級), 0.45µm 濾膜 (Millipore)。

c. 檢品之萃取及製備

1. 藥材萃取液之製備

1-1 金門龍鳳酒：

稱取三批不同來源之五味子、山萸肉、巴戟天、肉蓯蓉、肉桂及當歸等藥材各 10 g，加甲醇 100 mL 加熱迴流萃取 3 小時後，用濾紙過濾並用甲醇定容至 100 mL 後備用。

1-2 十全大補藥酒：

稱取三批不同來源之當歸、川芎、白芍、熟地黃、黨參、茯苓、白朮、甘草、肉桂及黃耆等藥材各 10 g，加甲醇 100 mL 加熱迴流萃取 3 小時後，用濾紙過濾並用甲醇定容至 100 mL 後備用。

1-3 萬應膏：

稱取三批不同來源之川烏、草烏、生地黃、白蘞、白芨、肉桂、白芷、當歸、赤芍藥、羌活、苦參、烏藥、甘草、獨活、元蓼、大黃及木鱉子等藥材各 10 g，加甲醇 100 mL 加熱迴流萃取 3 小時後，用濾紙過濾並用甲醇定容至 100 mL 後備用。

1-4 綠云膏：

稱取三批不同來源之黃連、大黃、元蓼、黃柏、木鱉子等藥材各 10 g，加甲醇 100 mL 加熱迴流萃取 3 小時後，用濾紙過濾並用甲醇定容至 100 mL 後備用。

2. 檢品製備

2-1 金門龍鳳酒及十全大補藥酒

- (1) 藥材：上述三批不同來源之各藥材之萃取液經減壓濃縮後，以 70% methanol 定容至 10 mL 並添加適量之內部標準物質後，經 0.45 μ m 濾膜過濾後成為 HPLC 定量分析之檢品。
- (2) 半成品：三批不同來源之藥材所浸泡一個月、二個月及三個月之金門龍鳳酒半成品，各取 1 mL 並添加 1 mL 之內部標準物質後，經 0.45 μ m 濾膜過濾後成為 HPLC 定量分析之檢品。
- (3) 成品：三批不同來源之藥材所浸泡之金門龍鳳酒成品，各取 1 mL 並添加 1 mL 之內部標準物質後，經 0.45 μ m 濾膜過濾後成為 HPLC 定量分析之檢品。

2-2 萬應膏及綠云膏

- (1) 藥材：上述三批不同來源之各藥材之萃取液經減壓濃縮後，以 70% methanol 定容至 10 mL 並添加適量之內部標準物質後，經 0.45 μ m 濾膜過濾後成為 HPLC 定量分析之檢品。
- (2) 油性膠體半成品及成品：三批不同來源之藥材添加油性膠體及賦形劑製成之萬應膏藥油性膠布半成品，各取 20 g 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，以 70% methanol 定容至 10 mL 並添加適量之內部標準物質後，經 0.45 μ m 濾膜過濾後成為 HPLC 定量分析之檢品。
- (3) 水性膠體半成品及成品：三批不同來源之藥材添加水性膠體及賦形劑製成之萬應膏藥油性膠布半成品，各取 20 g 加

methanol 250 mL 加熱迴流萃取 3 小時後，用濾紙過濾並將 methanol 層減壓濃縮乾後，以 70% methanol 定容至 10 mL 並添加適量之內部標準物質後，經 0.45 μ m 濾膜過濾後成為 HPLC 定量分析之檢品。

3. 分析方法之建立^(3~4)

a. 高效液相層析儀系統配備

1. 高效液相層析儀：Hitachi 系統
2. Autosampler L-7200
3. UV/Vis Detector L-7420
4. Pump L-7100
5. Interface D-7000
6. Hitachi D-7000 HSM softwar

b. 以 HPLC 來分離樣品，循以下步驟來求得適當的分離條件：

1. 按所要分析之樣品的特性，來選擇所要的層析模式、偵測器及偵測波長。
2. 決定最初的操作條件。
3. 進行第一次的操作條件。
4. 由實驗所得的層析圖，判斷改進分離結果所需改變的條件。
5. 以改變後的條件，進行再一次的實驗。
6. 重複步驟 4. 及 5.，直到求得最佳結果。
7. 決定高效液相層析條件包括固定相之層析管柱種類及長度、移動相溶媒系統、流速、檢測器波長及注入量等。

4. 標準溶液之製備

a. 金門龍鳳酒

1. loganin：18.75, 37.5, 75.0, 150.0, 300.0 μ g/mL.
2. scopoletin：3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 μ g/mL.
3. ferulic acid：1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μ g/mL.
4. cinnamic acid：2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 μ g/mL.
5. cinnamaldehyde：4.5, 9.0, 18.0, 36.0, 72.0 μ g/mL.
6. schizandrin：12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 μ g/mL.
7. gomisins A：5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 μ g/mL.

b. 十全大補藥酒

1. paeoniflorin：8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128.0 μ g/mL.
2. ferulic acid：6.75, 13.5, 27.0, 54.0, 108.0 μ g/mL.
3. cinnamic acid：7.75, 15.5, 31.0, 62.0, 124.0 μ g/mL.

4. cinnamaldehyde : 62.5, 125.0, 250.0, 500.0, 1,000.0 $\mu\text{g/mL}$.
5. glycyrrhizin : 129.75, 259.5, 519.0, 1038.0, 2076.0 $\mu\text{g/mL}$.
6. calycosin : 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 $\mu\text{g/mL}$.

c. 萬應膏

1. paeoniflorin : 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{g/mL}$.
2. ferulic acid : 6.0, 12.0, 24.0, 48.0, 96.0 $\mu\text{g/mL}$.
3. sennoside B : 18.75, 35.0, 75.0, 150.0, 300.0, 600.0 $\mu\text{g/mL}$.
4. sennoside A : 3.12, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 $\mu\text{g/mL}$.
5. aconitine : 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{g/mL}$.
6. harpagoside : 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{g/mL}$.
7. cinnamic acid : 2.38, 4.75, 9.5, 19.0, 38.0 $\mu\text{g/mL}$.
8. cinnamaldehyde : 24.88, 49.75, 99.5, 199.0, 398.0 $\mu\text{g/mL}$.
9. glycyrrhizin : 5.5, 11.0, 22.0, 44.0, 88.0 $\mu\text{g/mL}$.
10. emodin : 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{g/mL}$.
11. isoimperatorin : 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 $\mu\text{g/mL}$.

d. 綠云膏

1. coptisine : 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 $\mu\text{g/mL}$.
2. berberine : 7.5, 15.0, 30.0, 60.0, 120.0, 240.0 $\mu\text{g/mL}$.
3. sennoside A : 3.75, 7.5, 15.0, 30.0, 60.0, 120.0 $\mu\text{g/mL}$.
4. baicalin : 10.94, 21.88, 43.75, 87.5, 175.0, 350.0 $\mu\text{g/mL}$.
5. harpagoside : 1.09, 2.19, 4.375, 8.75, 17.5, 35.0 $\mu\text{g/mL}$.
6. baicalein : 10.94, 21.88, 43.75, 87.5, 175.0, 350.0 $\mu\text{g/mL}$.
7. emodin : 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{g/mL}$.

e. HPLC 分析條件

1. 金門龍鳳酒

- 1-1 層析管 : Inertsil 5 ODS-2, 4.6 mm I.D. \times 250 mm。
- 1-2 移動相 : 以 20% 及 70% acetonitrile 進行梯度沖提。
- 1-3 流速 : 1.0 mL/min。
- 1-4 注入體積 : 20 μL 。
- 1-5 檢測波長 : UV250 nm。

2. 十全大補藥酒

- 2-1 層析管 : Inertsil 5 ODS-2, 4.6 mm I.D. \times 250 mm。
- 2-2 移動相 : 以 10% 及 60% acetonitrile 進行梯度沖提。
- 2-3 流速 : 1.0 mL/min。
- 2-4 注入體積 : 20 μL 。

2-5 檢測波長：UV240 nm。

3. 萬應膏

3-1 層析管：Inertsil 5 ODS-2, 4.6 mm I.D.×250 mm。

3-2 移動相：以 10%及 60% acetonitrile 進行梯度沖提。

3-3 流速：1.0 mL/min。

3-4 注入體積：20 μ L。

3-5 檢測波長：UV250 nm。

4. 綠云膏

4-1 層析管：Inertsil 5 ODS-2, 4.6 mm I.D.×250 mm。

4-2 移動相：以 10%及 60% acetonitrile 進行梯度沖提。

4-3 流速：1.0 mL/min。

4-4 注入體積：20 μ L。

4-5 檢測波長：UV240 nm。

f. 檢量線之製備

1. 金門龍鳳酒

1-1 loganin： $y = 0.0201x + 0.0267$ ， $r = 1.0000$ ($n = 5$)。

1-2 scopoletin： $y = 0.0268x - 0.0058$ ， $r = 0.9999$ ($n = 5$)。

1-3 ferulic acid： $y = 0.0527x - 0.0693$ ， $r = 0.9944$ ($n = 5$)。

1-4 cinnamic acid： $y = 0.0464x + 0.0331$ ， $r = 0.9996$ ($n = 5$)。

1-5 cinnamaldehyde： $y = 0.0201x + 0.0212$ ， $r = 0.9998$ ($n = 5$)。

1-6 schizandrin： $y = 0.0272x + 0.0909$ ， $r = 0.9997$ ($n = 5$)。

1-7 gomisins A： $y = 0.0322x + 0.0337$ ， $r = 0.9995$ ($n = 5$)。

2. 十全大補藥酒

2-1 paeoniflorin： $y = 0.0024x - 0.003$ ， $r = 0.9997$ ($n = 5$)。

2-2 ferulic acid： $y = 0.0055x + 0.0017$ ， $r = 1.0000$ ($n = 5$)。

2-3 cinnamic acid： $y = 0.0024x + 0.0018$ ， $r = 0.9999$ ($n = 5$)。

2-4 cinnamaldehyde： $y = 0.0026x - 0.0009$ ， $r = 1.0000$ ($n = 5$)。

2-5 glycyrrhizin： $y = 0.0007x + 0.0157$ ， $r = 0.9999$ ($n = 5$)。

2-6 calycosin： $y = 0.0198x - 0.0003$ ， $r = 0.9999$ ($n = 5$)。

3. 萬應膏

3-1 paeoniflorin： $y = 0.0023x - 0.0002$ ， $r = 0.9998$ ($n = 5$)。

3-2 ferulic acid： $y = 0.0293x - 0.0047$ ， $r = 0.9998$ ($n = 5$)。

3-3 sennoside B： $y = 2.6663x + 0.0468$ ， $r = 0.9994$ ($n = 5$)。

3-4 sennoside A : $y=0.0057x+0.0007$, $r=0.9998$ ($n=5$).

3-5 aconitine : $y=0.0026x-0.0018$, $r=0.9998$ ($n=5$).

3-6 harpagoside : $y=0.0081x+0.0028$, $r=0.9999$ ($n=5$).

3-7 cinnamic acid : $y=0.0119x+0.0035$, $r=0.9999$ ($n=5$).

3-8 cinnamaldehyde : $y=0.0504x+0.0537$, $r=0.9997$ ($n=5$).

3-9 glycyrrhizin : $y=0.0504x+0.0329$, $r=0.9995$ ($n=5$).

3-10 emodin : $y=0.0144x+0.0268$, $r=0.9992$ ($n=5$).

3-11 isoimperatorin : $y=0.0053x+0.0019$, $r=0.9999$ ($n=5$).

4. 綠云膏

4-1 coptisine : $y=0.0406x-0.4600$, $r=0.9997$ ($n=5$).

4-2 berberine : $y=0.2790x+0.0296$, $r=0.9992$ ($n=5$).

4-3 sennoside A : $y=0.0078x+0.0059$, $r=0.9996$ ($n=5$).

4-4 baicalin : $y=0.0210x+0.0364$, $r=0.9991$ ($n=5$).

4-5 harpagoside : $y=0.0028x-0.0018$, $r=0.9994$ ($n=5$).

4-6 baicalein : $y=0.0237x+0.0075$, $r=0.9993$ ($n=5$).

4-7 emodin : $y=0.0181x+0.0449$, $r=0.9987$ ($n=5$).

(3) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之抽取率

a. 萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品抽取率

依(1)項 a. 及 c. 萬應膏及綠云膏藥膠布之半製品及製品檢品溶液的製取方法，製取得三批半製品及製品之 n-Hexane 及 EtOH 萃取液後，濃縮至乾，秤重，即得半製品及製品之抽取物總重，依下法求得二種藥膠布半製品及製品各三批之抽取率。

半製品或製品之抽取率(%) = 抽取物總重(g) / 樣品總重(g) × 100%

b. 金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品抽取率

由嘉義大學以 70%EtOH 浸泡，所得金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品。秤取約 10g 於蒸發皿內，於水浴器上加熱至乾，再放於 105℃烘箱中，乾燥 2 小時，移入乾燥器內冷卻，秤重，即得半製品及製品之抽取物總重，依下法求得二種藥酒半製品之抽取率。

半製品之抽取率(%) = 抽取物總重(g) / 樣品總重(g) × 100%

(4) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之總灰分

a. 萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品之總灰分

先將坩堝放入溫度 550°C 灰化爐中熾灼一小時後，移入硫酸銅乾燥器中放冷，精確稱重 (W_0)。分別稱取萬應膏及綠云膏藥膠布之半製品及製品各三批樣品約 2g，分別置入坩堝內 (W_1)，將坩堝置於電熱器上燒至無煙後，再放入灰化爐中，加坩堝蓋蓋妥。以溫度約 550°C 熾灼 4 小時至灰化完全，移入硫酸銅乾燥器中放冷後除蓋稱重 (W_2)。

依下法求得二種藥膠布之總灰分 (%)：

$$W_0 = \text{坩堝重量}$$

$$W_1 = \text{坩堝 + 檢品之重量}$$

$$W_2 = \text{坩堝 + 灰化後檢品之重量}$$

$$\text{總灰分 \%} = (W_2 - W_0) / W_1 - W_0 \times 100 \%$$

b. 金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之總灰分

先將坩堝放入溫度 550°C 灰化爐中熾灼一小時後，移入硫酸銅乾燥器中放冷，精確稱重 (W_0)。分別稱取金門龍鳳藥酒及十全大補藥酒之半製品及製品各三批樣品約 20g，分別置入坩堝內 (W_1)，將坩堝置於水浴器上蒸乾後，再放入灰化爐中，加坩堝蓋蓋妥。以溫度約 550°C 熾灼 4 小時至灰化完全，移入硫酸銅乾燥器中放冷後，除蓋稱重 (W_2)。

依下法求得二種藥酒之總灰分 (%)：

$$W_0 = \text{坩堝重量}$$

$$W_1 = \text{坩堝 + 檢品之重量}$$

$$W_2 = \text{坩堝 + 灰化後檢品之重量}$$

$$\text{總灰分 \%} = (W_2 - W_0) / W_1 - W_0 \times 100 \%$$

(5) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之酸不溶性灰分

將“總灰分”熾灼所得之總灰分(在原坩堝中)加入 25ml 稀鹽酸。打開抽氣櫃抽氣，將坩堝置於電熱器上煮沸五分鐘。加熱完成後，以無灰濾紙過濾，殘渣及濾紙以約 5ml 熱蒸餾水洗淨，再放入原坩堝中以 550°C 熾灼至三小時。待熾灼完全後放冷，精確稱重 (W_2)，依下法求得二種藥膠布及二種藥酒半製品及製品各三批之酸不溶性灰分百分率。

W_0 = 坩堝重量

W_1 = 坩堝 + 檢品之重量

W_2 = 坩堝 + 灰化後檢品之重量

酸不溶性灰分 $\%$ = $(W_2 - W_0) / (W_1 - W_0) \times 100 \%$

(6) 萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品之水抽取物

精確秤取萬應膏及綠云膏藥膠布各三批之半製品及製品各 2g (W_0)，倒入有栓之三角瓶，加入純水 70ml，以振盪機振盪 5 小時。振搖完成後靜置 16~20 小時，抽氣過濾，殘留物用約 10ml 純水水洗，將濾液倒至 100ml 定量瓶，加水至 100ml 刻度。蒸發皿於 105°C 之烘箱中乾燥 1 小時，置於乾燥器內放冷後精秤此重量 (W_1)。將濾液充分混合，精確量取此液 50ml，蒸發至乾，於 105°C 之烘箱中乾燥至恒量 (約 4 小時)，置於乾燥器內放冷後精秤此重量 (W_2)。依下法求得萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品各三批中所含水抽提物之含量 (%)。

W_0 = 半製品或製品重量

W_1 = 蒸發皿重

W_2 = 蒸發皿重 + 濾液殘渣之重量

水抽提物 $\%$ = $(W_2 - W_1) / W_0 \times 2 \times 100 \%$

(7) 萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品之稀醇抽取物

精確秤取萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品各約 2g (W_0)，倒入有栓之三角瓶，加入稀醇 (50% 乙醇) 70ml，以振盪機振盪 5 小時。振搖完成後靜置 16~20 小時，抽氣過濾，殘留物用約 10 ml 稀醇洗，將濾液倒至 100ml 定量瓶，加稀醇至 100ml 刻度。蒸發皿於 105°C 之烘箱中乾燥 1 小時，置於乾燥器內放冷後精秤此重量 (W_1)。將濾液充分混合，精確量取此液 50ml，蒸發至乾，於 105°C 之烘箱中乾燥至恒量 (約 4 小時)，置於乾燥器內放冷後精秤此重量 (W_2)。依下法求得萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品各三批稀醇抽提物之含量 (%)。

W_0 = 半製品或製品重量

W_1 = 蒸發皿重

W_2 = 蒸發皿重 + 濾液殘渣之重量

$$\text{稀醇抽提物 \%} = W_2 - W_1 / W_0 \times 2 \times 100 \%$$

(8) 萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品之乾燥減重

將蒸發皿以 100°C 乾燥 1 小時，置入乾燥器放冷後精重 (W_1)，取萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品各三批，各約 2g，精確秤重 (W_0)，平鋪於蒸發皿。蒸發皿放入 100°C 之烘箱中乾燥 5 小時後秤重，繼續乾燥，每隔一小時秤量一次，至先後兩次之減失重量相差不超過 0.25%，精確秤重 (W_2)，由其減失重量計算萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品之乾燥減重 (%)。

$$W_0 = \text{半製品或製品重量}$$

$$W_1 = \text{蒸發皿重}$$

$$W_2 = \text{蒸發皿重} + \text{濾液殘渣之重量}$$

$$\text{乾燥減重 \%} = W_2 - W_1 / W_0 \times 2 \times 100 \%$$

(9) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之溶劑殘留

萬應膏及綠云膏藥膠布之溶劑殘留，選定 n-Hexane 及 Acetone 二種溶劑，金門龍鳳藥酒及十全大補藥酒則選定 Methanol 及 Formaldehyde 二種溶劑殘留之檢驗，以氣相-質譜層析法 (GC/MS) 分析，萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品中 n-Hexane 及 Acetone 二種溶劑之殘留量。其檢驗方法詳見溶劑殘留檢驗法標準作業程序。

(10) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之重金屬檢驗

以原子吸光儀法 (A.A.) 測定萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品各三批中鉛、鎘、銅、砷及汞等五種重金屬含量。其檢驗方法，詳見重金屬限量之測定方法標準作業程序。

(11) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之微生物限度

以稀釋法及培養基方法，檢驗萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品各三批之總生菌數、黴菌、酵母菌總數、大腸桿菌、沙門氏桿菌、金黃色葡萄球菌及綠膿桿菌的限量試驗。其檢

驗方法，詳見微生物檢驗法標準作業程序。

(12) 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之微生物污染（黃麴毒素）檢驗

以免疫親和及 HPLC 方法檢驗萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品各三批之黃麴毒素 B1、B2、G1 及 G2 含量。其檢驗方法，詳見黃麴毒素之測定方法標準作業程序。

4. 萬應膏藥膠布已知皮膚穿透成分的動物藥效評估

由大仁技術學院負責。91 年度計劃由完成萬應膏、綠云膏水性及油性藥膠布的指標成分皮膚穿透、止痛、消腫與消炎等藥效評估研究，發現有 cinnamic acid、ferulic acid、sennoside B 及 baicalin 等指標成分穿透，為進一步了解這些穿透皮膚的指標成分，以小白鼠及大白鼠進行穿透量較大之 cinnamic acid 及 ferulic acid 二指標成分之止痛、消腫與消炎藥效評估，以瞭解這些皮膚穿透指標成分與藥效間之關係。其步驟如下：

a. 止痛藥效動物試驗⁽⁵⁾

試驗動物為 ICR 小白鼠（公；7 週齡）。試驗期間，飼料飲水均採任食。並於試驗前，禁食 24 小時。試驗共分為三組，分別為負控制組（不給藥）、正控制組（Indomethacin 適當劑量）及實驗組（Cinnamic acid 及 Ferulic acid 適當劑量）。將受試藥物行腹腔注射（ip）一小時後，再以 0.6 % 醋酸（acetic acid）行腹腔注射。觀察 10 分鐘內，小白鼠的 Writhing 次數。每組 6 隻，取平均值，再作統計檢定比較其效果差異。

b. 消腫藥效動物試驗⁽⁵⁻⁶⁾

試驗動物為 Wistar 大白鼠（公；6 週齡）。試驗期間，飼料飲水均採任食。並於試驗前，禁食 24 小時。試驗共分為三組，分別為負控制組（不給藥）、正控制組（Indomethacin 適當劑量）及實驗組（Cinnamic acid 及 Ferulic acid 適當劑量）。將受試藥物行腹腔注射一小時後，以皮內注射 0.1 mL 的 Carrageenan（10 mg/ mL in saline）誘導足蹠腫脹。注射後 3 小時，以 Plethysmometer 裝置測量其兩足蹠的腫脹體積，以下列公式計算其消腫率，每組 6 隻，取平均值，再作統計檢定比較其效果差異。

腫脹百分比（%）=（注射後 3 小時的腫脹後體積－注射後 0 小時的腫脹後體積）/ 注射後 0 小時的腫脹後體積 × 100

c. 消炎藥效動物試驗⁽⁷⁾

試驗動物為 Wistar 大白鼠（公；6 週齡）。試驗期間，飼料飲水均採任食。並於試驗前，禁食 24 小時。試驗共分為三組，分別為負控制組（不給藥）、正控制組（Indomethacin 適當劑量）及實驗組（Cinnamic acid 及 Ferulic acid 適當劑量）。將受試藥物行腹腔注射一小時後，再自尾靜脈注射 Pontamine sky blue 6BX 溶液（4 %；2.5 mL/ kg B.W.）。2-3 分鐘後，腹部行皮內注射 0.05 mL Histamine（0.33 % in saline）。30 分鐘後犧牲大白鼠，將注有 Histamine 處之皮膚（2×2 cm）取下。經細切後置於離心管（25 mL）內，再加入 3 mL Trichloroacetic acid（5 %）。18 小時後置於研鉢內研磨，研磨後的泥狀物再以適量的 Trichloroacetic acid（5 %）洗出，並置於離心管（25 mL）內離心（900 g；10 分鐘）。沈澱物再以 3 mL Pyridine 溶液（25 % in water）萃取 40 分鐘（80℃）。萃取液再經離心（900 g；10 分鐘），即可取得上清液。上清液加入 2 mL 氯仿，經震盪（1 分鐘）後離心。以 Spectrophotometer 測定“上層液”（Pyridine 層）之 600 nm 吸光度以分析染料滲透出微血管之程度來評估其消炎藥效。每組 6 隻，取平均值，再作統計檢定比較其效果差異。所得結果期能了解皮膚穿透指標成分與藥效間之關係。

d. 統計分析

試驗組間的差異以 Duncan's new multiple range test 進行檢定； $p < 0.05$ 即有顯著的差異。

5. 以替代方法評估中藥藥膠布之皮膚過敏性研究

由嘉南藥理科技大學楊竹茂教授負責。

1. 刺激性反應

1.1 動物皮膚刺激性試驗

1.1.1 萬應膏及綠云膏成品皮膚刺激性試驗

1.1.2 萬應膏及綠云膏處方個別藥材皮膚刺激性試驗

1.2 人體表皮組織套組 EpiDerm™（EPI-200 kit）皮膚刺激性試驗

2. 過敏性反應

1.1 動物皮膚過敏性試驗

1.2 萬應膏及綠云膏成品皮膚過敏性試驗

3. 測試方法

3.1 動物皮膚刺激性試驗---萬應膏及綠云膏成品皮膚刺激性試驗

3.1.1 受試品之準備：將受試藥膠布成品剪成 2.5 x 2.5 公分

3.1.2 動物品種：健康、無皮膚病之紐西蘭種大白兔，體重 2.0 公斤～2.5 公斤，雌雄不拘

3.1.3 動物數量：每組六隻

3.1.4 試驗步驟

測試前一天將動物背毛剃除，測試當日，每隻動物背部分為 2 區，一區貼不含藥物之空白貼布，另一區則貼受試貼布，以不引起刺激性之 3M 膠帶將貼布四周密封固定，經 24 小時後撕開貼布，以潤濕之棉花棒輕輕擦拭貼處以清除殘留受試物質。

3.1.5 測試結果評估

在撕開貼布後第 1、24、48 及 72 小時，以「皮膚刺激性計分系統」觀察並記錄貼藥膠布處的皮膚反應，包括是否產生紅斑、浮腫、結痂、腐蝕或其他毒性現象與恢復情形等。

若受試藥膠布引起皮膚之刺激性反應超過 72 小時，必須持續觀察並記錄皮膚反應至第 14 天止，以評估此種皮膚反應是否為可逆或不可逆。

皮膚刺激性計分系統

Skin Reactions	Score
Erythema and Eschar Formation (紅斑及結痂)	
No erythema (無紅斑)	0
Very slight erythema (barely perceptible) (恰可辨認之非常輕微紅斑)	1
Well-defined erythema (顯著紅斑)	2
Moderate to severe erythema (中度至嚴重紅斑)	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth) (嚴重紅斑至輕微結痂形成)	4
Necrosis (depth of tissue) (組織壞死)	+N
Eschar (sloughing or scab formation) (痂皮形成)	+E
Edema Formation (浮腫形成)	

No edema (無浮腫)	0
Very slight edema (barely perceptible) (恰可辨認之非常輕微的浮腫)	1
Slight edema (edges of area well-defined by definite raising)(輕微浮腫，浮腫區域邊緣可明顯區別)	2
Moderate edema (raised approximately one millimeter) (中度浮腫，大約 1 mm)	3
Severe edema (raised more than one millimeter and extending beyond the area of exposure) (嚴重水腫，大於 1 mm 且延伸至暴露區域)	4

Primary Dermal Irritation Index, PDII (皮膚刺激指數) = Score / No. observation

No. observation (觀察次數) = 3 天 x 6 隻動物 = 18

PDII = 0.0 nonirritant 完全無刺激性)

> 0.0~0.5 negligible irritant (幾乎無刺激性)

> 0.5~2.0 mild irritant (弱刺激性)

> 2.0~5.0 moderate irritant (中度刺激性)

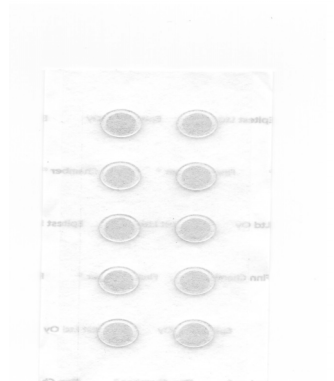
> 5.0~8.0 severe irritant (嚴重刺激性)

3.2 動物皮膚刺激性試驗---萬應膏及綠云膏處方個別藥材皮膚刺激性試驗

(Finn Chamber 之 Patch Test)

3.2.1 受試品之準備：處方中各藥材分別經以 50% 乙醇萃取及減壓濃縮至浸膏樣供直接測試。另以水溶解浸膏成 1：10 稀釋溶液（必要時可添加 1% Tween 20 助溶）

3.2.2 材料之準備：Finn Chamber（每片 Chamber 含 10 個貯藥槽）如下圖：



3.2.3 動物品種：如 3.1.2

3.2.4 動物數量：3 隻

3.2.5 試驗步驟

使用 Finn Chamber,於每一 chamber 注入 25mg 各藥材萃取物，貼於已剃除背毛之皮膚，觀察紀錄貼後 24、48 及 72 小時皮膚之反應，依皮膚刺激性計分系統評分法 評估其皮膚刺激性指數 (Primary Dermal Irritation Index) (如 3.1.5)



3.3 人體表皮組織套組 EpiDerm™ (EPI-200 kit) 皮膚刺激性試驗

3.3.1 受試品之準備：萬應膏及綠云膏處方個別藥材（為由黃秀琴副教授抽提，提供。個別粉碎藥材 10g，加水 100ml 於水浴器中加熱迴流 30 分，冷卻，過濾，取濾液，濃縮至乾。）之 10 倍稀釋液，另外準備萬應膏及綠云膏半製品（即塗布前藥材浸膏與黏膠之煉合物）與不含藥物之空白黏膠。

3.3.2 材料之準備：EpiDerm™ (EPI-200 kit) 購自美國 MatTek Co.

3.3.3 試驗步驟：依據 MatTek Co. n 所提供之操作細節操作（如下）

EpiDerm™ (EPI-200 kit) 操作細節

材料：

自備材料：

滅菌鈍尖夾子	用於將組織移出 agarose
500 ml 洗瓶	用於樣品暴露後沖洗組織
200 ml 燒杯	用於收集 PBS 廢液
滅菌拋棄式 pipettes, tips	用於稀釋、加藥、移除培養基
37°C 5%二氧化碳培養器	用於分析前即分析中之組織培養

真空抽氣機	用於吸出溶液
無菌操作箱	用於在無菌條件下轉移組織
37°C 水浴	用於將培養基及 MTT 溶液加溫
研鉢	用於研磨顆粒物
可調式 pipet 1 ml	用於在 Inserts (0.9 ml) 下加入分析培養基
Pipet 300 µl	用於將 MTT 培養基加入 24-孔培養皿
Pipet 2 ml	用於將 MTT 萃取液加入 24-孔培養皿
Pipet 200 µl	用於從 24-孔培養皿中將萃取出 formazan 加入 96-孔培養皿以測定吸光度
Pipet 50 µl	用於加入液態測試樣品
96-孔光度計 570 或 540 nm	用於讀吸光度
Microtiter 震盪器	用於萃取 formazan
定時器	用於應用測試樣品之計時
KOH, 8N	用於每一個 Kit 之陽性控制組
Dulbeccos PBS	用於沖洗組織、稀釋
HCl, NaOH	用於調整 PBS 之 pH
蒸溜水	用於做為陰性控制組
兩個附加 24-孔培養皿	用於製備”holding plates”

EPI-200 Kit 所含成分

Sealed 24-well plate	1	含 24 個 插在 agarose 的組織
24-well plates	2	用於 MTT viability 分析
6-well plates	4	用於貯存 inserts, 局部應用測試劑
Serum-free Assay Medium	1 瓶	DMEM 培養基
PBS Rinse Solution (100 ml)	1 瓶	在 MTT 分析中用於沖洗 Inserts
1% Triton X-100 (10 ml)	1 瓶	皮膚刺激劑參考化學品
MTT Assay Protocol	1	

MTT-100 Assay kit 成分

MTT 濃縮液	1 瓶 2ml	
MTT 稀釋液	1 瓶 8ml	MTT 分析前用於稀釋 MTT
Extractant solution Isopropanol	1 瓶 60ml	用於萃取 formazan 結晶

方法:

實驗套組的有效期及保存: Epi-200 每週一由波士頓寄出, 如可能的話, 確認在週二到達實驗室。在收到 EpiDerm™ (EPI-200) 組織後, 將密封的 24-孔培養皿及分析培養基放入 4°C 冰箱貯存。將 MTT 濃縮液放入

-20°C，及 MTT 稀釋液放入 4°C 冰箱貯存。

編號	內容描述	貯存條件	有效期限
Epi-200	EpiDerm™ (EPI-200)	4°C 冰箱	投遞當週週五
Epi-100	分析培養基	4°C 冰箱	7 天
MTT-099	MTT 稀釋液	4°C 冰箱	7 天
MTT-100	MTT 濃縮液	-20°C 冷凍櫃	2 月

紀錄所有顯示在方法文件 (MDS) 上各成分標籤之批號

品質管制

分析接受原則 1: 陰性控制組

在 Kit 寄出及貯存程序後依照特異分析條件所進行實驗室 MTT 試驗中，陰性控制組之 OD₅₇₉ 或 OD₅₄₀ 絕對值為組織變異度的指標。兩個組織的平均 OD >= 0.8 為符合接受原則。

分析接受原則 2: 陽性控制組

1% Triton X-100 做為陽性對照品，必須依照實驗步驟測試。經 3 分鐘的處置將顯示~20%之平均相對組織變異度 (mean relative tissue viability)。如果 3 分鐘的陽性控制組織平均相對組織變異度為 ≤ 30%，則此分析符合接受原則。

組織間之最大變異度差

在本試驗計畫，每一化合物每一暴露時間 (3 分鐘及 N 小時) 須進行兩個組織。依照在 ZEBET 所存之原始數據，重複未處理的組織之間平均差為 9% ± 7% (SD)。同時處理的兩個組織之間的差異 > 30% 將被視為達到排斥原則，如果所得結果靠近此排斥值 (cut-off) 則必須重複試驗。

注意: 需要時計算兩組織平均值與兩者之一之間的差異，如果差異 > 15% 也必須考慮為須排斥。

配製

MTT 溶液 (測試當天新鮮配製)

將 MTT 濃縮液 (MTT-100) 溶化，以 MTT 稀釋液 (MTT-099) 稀釋。貯存 MTT 溶液於 4°C 暗處供測試當日使用 (勿隔日使用)

注意: 某些測試化合物可能還原 MTT 而顯現藍色，並不涉及細胞粒腺體脫氫酵素 (cellular mitochondrial dehydrogenase)，雖然本分析方法在使組織接觸 MTT 培養液之前已沖洗過測試化合物，同時也改變組織下面之 DMEM 培養

基，但可能也有少量的化合物會由組織釋出而直接還原 MTT，此部份將被解釋為組織變異性（tissue viability）。

為檢查 MTT 還原能力可配製 MTT 的 DMEM 溶液(1.0 mg/ml)，將約 100l（液體測試物）或 30 mg（固體測試物）加到 1ml MTT 培養基。如果經室溫一小時後混合液轉成藍紫色，即假設此測試物能還原 MTT。此檢查法僅能用於解釋非預期的結果，而不能用於結果的定量校正。

Dulbecco's PBS

使用 ICN FLOW 10x DPBS（Cat. No. 196 1054）以蒸溜水稀釋十倍並以 NaOH 或 HCl 調整 pH 至 7.0。

注意: 1 升足以 1 組 Kit 操作沖洗使用。如果 PBS 由 10 倍濃縮液或粉末配製而且無滅菌，則勿使用超過 1 週。

測試物

安全指導

1. 處理無法律編號的測試化合物（non-coded test chemicals）須依照各化合物個別安全指示處理
2. 如果有編號的化合物係由 BIBRA 供應，將不提供有關安全處理之訊息，因此所有測試物必須假設為腐蝕物（corrosives）處理並且依化學安全指導操作（使用抽氣柜、戴手套、保護眼睛及臉）。

除了固體物之外，所有測試物皆直接應用（不稀釋）

液體：取 50 μ l 直接置於 Epi-200 組織上面。必要時可將測試液擴散配合組織大小。

半固體：使用 positive displacement pipet 直接取 50 μ l 置於 Epi-200 組織上面，必要時可將測試液擴散配合組織大小。

固體：已研鉢研碎測試物，以 25 mg 專用藥匙（application spoon）取粉末 25 mg，加 25 μ l 水濕潤測試物（必要時可增加水量）。必要時可將測試物擴散配合組織大小。

實驗步驟

注意: 由於本實驗以表皮模式在 5 小時內操作，無菌狀態不如應用 EpiDerm 於其他試驗重要，然而保持分析培養基於無菌狀況也很重要，同時不受污染。

實驗前一日

1. 在收到 EpiDermTM（EPI-200）組織後，將密封的 24-孔培養皿及分析培養基

放入 4°C 冰箱貯存。將 MTT 濃縮液放入 -20°C，及 MTT 稀釋液放入 4°C 冰箱貯存。

2. 依照 Dulbecco's PBS 配製 PBS

實驗當日

附註：每一套組可用於測試 4 種測試化合物，陰性及陽性控制組，每一種各重複測試兩個組織及 3 分鐘接觸與 N 小時接觸之實驗。實驗設計可先完成 3 分鐘之測試，再進行 N 小時之測試，或者可兩種同時測試。下列步驟說明同時測試之步驟。

- (1) 處理前先將分析培養基 (assay medium) 在 37°C 水浴中回溫。
- (2) 吸取 0.9 ml 培養基於 4 個無菌 6-孔培養皿之每一孔
- (3) 至少在加藥前 N 小時，將 EPI-200 從冰箱取出，在無菌條件下使用無菌夾子將 inserts 移到 4 個預先置放 0.9 ml 培養液之 6-孔培養皿中。
附註：小心去除所有黏在 inserts 上之 agarose。任何附著在 insert 下之氣泡必須釋放掉，在培養皿 6 個孔邊緣及底部標示測試物。
- (4) 將置有組織之 4 個 6-孔培養皿放入已濕氣化的 37°C，5% CO₂ 之培養箱至少 N 小時 (預孵 Pre-incubation)。
- (5) 依照 **MTT 溶液** 配製法配製 MTT 溶液。
- (6) 在完成預孵之前，準備兩個 24-孔之培養皿做為 "holding plates"，一個為 3 分鐘實驗，另一個為 N 小時實驗之用。除外，另準備兩個 24-孔培養皿做為 MTT 分析之用：使用下列設計。吸量 300 μ l 之預溫 assay medium 或 MTT 培養基於每一孔。將四個培養皿放入培養箱。

24-well plate design (作為 "holding plates" 及用於 MTT 分析)

Holding plate

PC	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	NC

N hr

MTT 分析 (incubated for 3 hours)

PC	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	NC

N hr

NC = Negative Control C1 ~ C4 = Test Chemical PC = Positive Control

- (7) 預孵 N 小時之後以 0.9 ml 新鮮 assay medium 取代所有 4 個 6-孔培養皿。
將兩個 6-孔培養皿 (供 3 分鐘實驗) 放回培養箱，另外兩個 6-孔培養皿作為 N 小時實驗之用。使用下列設計：

PC	1	2
3	4	5

Plate A (N hour)

12	13	14
15	16	17

Plate B (N Hour)

6	7	8
9	10	11

Plate C (N hour)

18	19	20
21	22	NC

Plate D (N Hour)

- (8) **N 小時實驗**：加 50 μ l 水 (negative control) 到 EpiDerm (EPI-200) 組織之最後 1 個 insert atop。將計時器設定一小時並開始啟動，第二個組織重複步驟。進行 1~22 測試樣品及 PC 直到 24 個組織皆給藥且被沖洗過。將兩個 plates 放入培養箱 (37°C, 5% CO₂)。在 MDS 紀錄開始時間。
- (9) **3 分鐘實驗**：加 50 μ l 水 (negative control) 到 EpiDerm (EPI-200) 組織之第一個 insert atop。重要：在每一次給藥之間維持一定間隔時間 (如 40 秒)。在 3 分鐘後，立即以夾子將第一個 insert 從 6-孔 plate 中移除。使用洗瓶以 PBS 溫和沖洗組織 (20 次) 以去除殘存試樣。以溫和振搖 insert 以去除過剩的 PBS，並以吸濕濾紙吸乾底部。將 insert 放入準備好的 holding plate。進行 1~4 測試樣品及 PC 直到 12 個組織皆給藥且被沖洗過。
- (10) **3 分鐘**：一旦所有組織已在 holding plate 中給藥且沖洗過，從 holding plate 中去除 inserts，吸乾底部，轉移至 24-孔盤，準備進行 MTT 分析。將培養皿放入培養箱，在 MDS 紀錄 MTT 分析開始培養時間，在 37°C, 5% CO₂ 培養箱中培養 3 小時。
- (11) **N 小時**：在測試樣品在培養箱中暴露達 N 小時後，以夾子將第一個 insert 從 6-孔盤中移走。使用洗瓶以 PBS 溫和沖洗組織 20 次以去除殘留測試樣品。小心溫和振盪 insert 以去除過多 PBS，以濾紙吸乾底部。將 insert 放入預備之 holding plate。以同樣步驟操作其他所有測試樣品及 PC。
- (12) **N 小時**：一旦所有組織已在 holding plate 中沖洗過，從 holding plate 中去除 inserts，吸乾底部，轉移至 24-孔盤，準備進行 MTT 分析。將培養皿放入培養箱，在 MDS 紀錄 MTT 分析開始培養時間，在 37°C, 5% CO₂ 培養箱中培養 3 小時。
- (13) **3 分鐘**：在完成 3 小時之 MTT 培養後，將 MTT 培養基以抽氣 pump

溫和地從所有的 24 孔中抽掉，再以 PBS 0.9 ml 回注每一孔，再抽乾，重複兩次，並且確保在最後一次抽乾後之組織是完全乾的。將 inserts 移至新的 24-孔培養皿。

- (14) 3 分鐘：吸取 2 ml 萃取液 (isopropanol) 加入每一個 insert 中以浸漬 insert，使其液面昇到 insert 上部邊緣，恰能覆蓋組織兩側。
- (15) 3 分鐘：以拉鍊袋將 24-孔盤密封以防止 isopropanol 揮發。在 MDS 紀錄萃取開始時間，在室溫下以隔夜放置，或以培養皿振盪機 (120 rpm) 振盪 2 小時。
- (16) N 小時：在完成 3 小時之 MTT 培養後，將 MTT 培養基以抽氣 pump 溫和地從所有的 24 孔中抽掉，再以 PBS 0.9 ml 回注每一孔，再抽乾，重複兩次，並且確保在最後一次抽乾後之組織是完全乾的。將 inserts 移至新的 24-孔培養皿。
- (17) N 小時：吸取 2 ml 萃取液 (isopropanol) 加入每一個 insert 中以浸漬 insert，使其液面昇到 insert 上部邊緣，恰能覆蓋組織兩側。
- (18) N 小時：以拉鍊袋將 24-孔盤密封以防止 isopropanol 揮發。在 MDS 紀錄萃取開始時間，在室溫下以隔夜放置，或以培養皿振盪機 (120 rpm) 振盪 2 小時。

第 2 天 (只限以隔夜放置萃取 formazan)

- (19) 在完成萃取後，以注射針 (20 gauge, 0.9 mm 直徑) 穿破 inserts 使萃取液能流入每一孔內。然後將 inserts 拿掉，將 24-孔盤振盪 15 分鐘使溶液之顏色均勻。
- (20) 每一組織之萃取液各由孔內吸取 200 μ l x 3 放入 96-孔盤之 3 個孔內 (即每一組織萃取液分別測 3 次 OD)。以 Reader 在 570 nm~540 nm 波長下測定吸光度 (不用 reference filter)，計算時使用其 3 次吸光值之平均值。
- (21) 存活率計算 (Calculate % viability) : $\% \text{ viability} = 100 \times [\text{OD} (\text{sample}) / \text{OD} (\text{negative control})]$

96-盤之分配

PC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC

(22) 結果判定：依據 Benchmark ET-50 values and groupings

As a general guideline, the following groupings can be used in assigning expected *in vivo* irritancy responses based on the ET-50 results obtained using EPI-200:

ET-50 (hrs)	Expected <i>In vivo</i> Irritancy	Example
< 0.5	strong/severe, possible corrosive	Conc. Nitric acid
0.5-4	moderate	1% Sodium Dodecyl Sulfate
4-12	moderate to mild	1% Triton X-100
12-24	very mild	Baby shampoo
24	non-irritating	10% Tween 20

附註： 1. 因本試驗所測試之樣品為中藥藥材之水萃取物，依常理判斷應不具強烈腐蝕作用，因此不需進行 3 分鐘之暴露試驗。

2. 本試驗中各受試物之編號如下：

PC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1%TX	萬應膏	白芷	羌活	白及	木鱉	元參	生地	黏膠	甘草	烏藥	赤芍
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC
肉桂	草烏	川烏	當歸	獨活	大黃	萬應膏	黃芩	黃連	黃柏	綠云膏	水

PC: Positive control NC: Negative control 1%TX: 1% Triton X-100

3.4 動物皮膚過敏性試驗

3.4.1 受試品之準備：將受試藥膠布成品剪成 2.5 x 2.5 公分陽性對照
採 1% 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 酒精溶液

3.4.2 動物品種：健康、無皮膚病之白色天竺鼠（Hartley Strain），體

重 350 公克~400 公克，雌雄不拘

3.4.3 動物數量：每組使用六隻

3.4.4 試驗步驟

誘導期 (Induction Period)：實驗開始前，剃除動物背毛，以受試藥膠布 (2.5 x 2.5 公分) 貼於背部皮膚 6 小時以進行過敏誘發。此項誘發反應每星期實施一次，每次 6 小時，共進行 3 星期。每次誘發前也需要剃除動物背毛。

激發期 (Challenge)：誘發期滿後，再剃除被毛，在別於誘發部位以受試藥膠布貼膚 6 小時，撕開膠布後依 4.1.5 測試結果評估方法觀察並記錄激發後第 24、28 小時之皮膚反應，其反應程度可與陽性對照組比較加以判別。

6. 十全大補藥酒增強外因性免疫功能低下小鼠之免疫功能與造血機能之研究

為更明確證實十全大補藥酒之免疫增強與造血機能，以腹腔注射抗癌藥 cyclophosphamide 造成小鼠之免疫功能低下，分析餵食十全大補藥酒之小鼠免疫功能中脾臟重量、脾臟細胞數目及各免疫細胞數目及比例、血清中細胞激素如 IL-3、GM-CSF、M-CSF 等及血球幹細胞生長激素 SCF 含量等。其步驟如下：

A. 藥酒製劑：十全大補藥酒製劑乃自三家藥廠所提供之藥材，由嘉義大學曾慶瀛教授所製備，其酒精濃度為 14%，藥酒製劑所有之配方及泡製溫度、時間等條件由曾慶瀛教授所主持之子計劃：中藥藥膠布及藥酒製劑成分分析及其釋出效應之研究 (3-3) - 中藥酒製程規格化及其貯存安定性之研究中詳列。本實驗選擇泡製兩個月，藥廠提供之藥材成分分析最佳者進行實驗。

餵食劑量參考第一年計畫之 10 μ l/day/mouse 與 30 μ l/day/mouse 後，改為 10 μ l/day/mouse 與 50 μ l/day/mouse，以觀察更高劑量是否增加藥酒對免疫功能促進之功效

B. 實驗動物：選用單一性別之純種小鼠 (inbred mice, BALB/c 小鼠, 8-12 週大)。選購來源為國家實驗動物中心或國立成功大學醫學院附設動物中心，並養殖於成大醫學院動物中心。

每日餵食藥酒一次，在餵食一個月與兩個月後，於給予腹腔注射 cyclophosphamide 造成免疫抑制，並持續餵食藥酒。餵食組別包括：

A 組：腹腔注射 2 mg/kg (day 0) 與 4 mg/kg (day 4)
cyclophosphamide

Group 1 不餵食藥酒

Group 2 餵食 10 μ l/day/mouse 調味酒精

Group 3 餵食 10 μ l/day/mouse 十全大補藥酒

Group 4 餵食 50 μ l/day/mouse 調味酒精

Group 5 餵食 50 μ l/day/mouse 十全大補藥酒

B 組：腹腔注射 4 mg/kg (day 0) 與 8 mg/kg (day 4)
cyclophosphamide

Group 1 不餵食藥酒

Group 2 餵食 10 μ l/day/mouse 調味酒精

Group 3 餵食 10 μ l/day/mouse 十全大補藥酒

Group 4 餵食 50 μ l/day/mouse 調味酒精

Group 5 餵食 50 μ l/day/mouse 十全大補藥酒

C 組：腹腔注射 200 mg/kg (day 0) cyclophosphamide

Group 1 餵食 10 μ l/day/mouse 調味酒精

Group 2 餵食 50 μ l/day/mouse 調味酒精

Group 3 餵食 10 μ l/day/mouse 十全大補藥酒

Group 4 餵食 50 μ l/day/mouse 十全大補藥酒

A 與 B 組於第二次注射 cyclophosphamide 後於第一次注射算起第十天犧牲小鼠，而 C 組於首次注射 cyclophosphamide 後於第三、五、十、與第二十天犧牲小鼠，抽血以製備血清，並取其脾臟供後續實驗，包括計算脾臟重量、脾臟細胞數目與偵測巨噬細胞百分比等。

C. 巨噬細胞族群百分比之偵測

細胞以 anti-F4/80 螢光抗體結合，並以流式細胞儀偵測。取 1×10^6 cell 脾臟細胞。加入 5 μ l anti-F4/80 螢光抗體，充分混合均勻後，放進 4°C 冰箱避光作用 40 分鐘。作用完畢後，加入 2 ml FACScam medium 清洗，經離心 (1500 rpm, 10 min, 4°C)，倒掉上清液。在重複清洗兩次後離心 (1500 rpm, 10min, 4°C) 後，倒掉上清液。各管加入 0.3 ml FACScam medium，於六小時內進行流式細胞分析 (Flow cytometry analysis)。分析項目包括 FSC (細胞大小)、SSC (細胞內顆粒多寡) 與 FL-1 (螢光)。

D. 血漿中 IL-3、GM-CSF、M-CSF 與 SCF 等造血細胞所需之生長及分化因子之測量。以購買 ELISA KIT 來測試。血清以試劑組中指定之緩衝液做

兩倍 稀釋，將稀釋之之血清，以及指定濃度之標準品和控制檢品，分別加入已經附著抗體之 96 孔檢測盤，於室溫反應兩小時（將檢測盤置於每分鐘 50 轉的速度水平擺動器上），以試劑組中之清洗緩衝液洗滌檢測盤四次，加入已鍵結過氧化氫酶之抗體，同樣於室溫下作用兩小時。次清洗後加入試劑組的受質呈色劑，逾 30 分鐘後加入反應終止劑後，以 EIA reader 偵測（吸收波長為 450 nm）各檢體所含激素之相對濃度。顏色（呈黃色）越深代表該激素於血清中濃度越高。

參、結果

1.再製作萬應膏、綠云膏的水性及油性藥膠布各三批

委託 GMP 中藥廠製造萬應膏、綠云膏水性及油性藥膠布各三批已完成，並完成二處方之水性及油性藥膠布之製造管制標準作業程序。

2.再製作金門龍鳳藥酒及十全大補藥酒各三批

委託嘉義大學製造 14%酒精濃度之金門龍鳳藥酒及十全大補藥酒各三批已完成（依圖 1 及圖 2 流程），並完成二處方之製造管制標準作業程序，及完成藥酒製品之各項分析。

（1）藥酒成品之可溶性固形物、酒精度及總生菌數之分析

表一為三家藥廠浸泡製成之藥酒成品，其可溶性固形物、酒精度含量及其總生菌數之分析情形。於結果顯示，在可溶性固形物方面之含量，介於 28.0~30.0⁰Brix、酒精度含量在 13.0~14.0%之間，其含量方面變動不大。在生菌數之檢測上，三家藥廠浸泡製成之藥酒成品，其總生菌數、黴菌及大腸桿菌群，均未檢測出含量。

（2）金門龍鳳藥酒成品於澄清度改善前後吸光值之比較

表二為金門龍鳳藥酒成品於澄清度改善前後其吸光值及色度、色調之比較，由表中結果顯示，在 A_{420} 及 A_{520} 吸光值方面，改善前之 90 年龍鳳酒分別為 1.86 及 1.01，其值均明顯大於改善後之龍鳳酒（0.00~0.73），又如圖 3 結果所示，三家藥廠製成之龍鳳酒吸光值均低於 90 年之龍鳳酒，故於改善後之藥酒，其澄清度效果高於改善前之藥酒。

在色度及色調方面，表二中結果顯示，90 年龍鳳酒之色度 2.88 是明顯高於改善後之藥酒（0.50~0.86）；而 90 年龍鳳酒之色調 1.84 則是明顯低於改善後之藥酒（5.44~91.17），其差異之明顯比較又如圖 4 結果所示。

（3）十全大補酒成品於澄清度改善前後吸光值之比較

表三為十全大補藥酒成品於澄清度改善前後其吸光值及色度、色調之比較，由結果顯示，在 A_{420} 及 A_{520} 吸光值方面，改善前之 91 年十全大補藥酒分別為 2.38 及 1.30，其值均大於改善後之十全大補藥酒（0.10~2.00），其差異之明顯比較又如圖 5 結果顯示，三家藥廠製成之十全大補藥酒吸光值均低於 91 年之十全大補藥酒，故於改善後之藥酒成品，其澄清度效果高於改善前之藥酒。

在色度及色調方面，表三中結果顯示，91 年十全大補藥酒之色度 3.68 是明顯高於改善後之藥酒（1.25~2.27）；而 91 年十全大補藥酒之色調 1.83 則是明顯低於改善後之藥酒（5.63~11.05），其差異之明顯比較又如圖 6 結果所示。

（4）金門龍鳳藥酒成品於澄清度改善前後色澤之比較

表四為金門鐘鳳藥酒成品於澄清度改善前後 L.a.b 值之比較，90 年龍鳳酒之 L 值在亮度的表示結果中（38.92），明顯低於改善後之藥酒成品（75.19~86.61），其差異之明顯比較如圖 7 所示。在 a 值方面結果顯示，90 年龍鳳酒之 a 值偏高（5.97），較偏向紅色色澤，而改善後藥酒成品之 a 值偏低（-0.02~1.29），如圖 8 所示，可明顯看出差異。在 b 值方面，改善後之藥酒成品 b 值（24.45~27.70）較 90 年龍鳳酒高（20.93），較偏向黃色，其差異情形如圖 9 所示。

（5）十全大補藥酒成品於澄清度改善前後色澤之比較

表五為十全大補藥酒成品於澄清度改善前後 L.a.b 值之比較，91 年十全大補藥酒之 L 值在亮度的表示結果中（25.10），明顯低於改善後之藥酒成品（66.99~79.59），其差異之明顯比較如圖 7 所示。在 a 值方面結果顯示，91 年十全大補藥酒之 a 值（-0.26）偏向綠色，明顯低於 92 年之藥酒成品（4.59~4.85），較偏向紅色色澤，如圖 8 所示，可明顯看出差異。在 b 值方面，改善後之藥酒成品 b 值（34.20~39.81）較 91 年十全大補藥酒高（12.75），較偏向黃色，其差異情形如圖 9 所示。

（6）官能品評

表六為 90、91 年及 92 年龍鳳酒及十全大補藥酒成品之官能品評，於表中結果顯示，在香氣、色澤、口感及整體接受性方面來說，90 及 91 年度之藥酒成品，其分數介於（2.00~4.07）之間，而 92 年之藥酒成品在品評項目中之分數，皆位在 3 分尚可接受的標準以上，於整體接受性方面，92 年藥酒成品之接受度（3.71~4.14）皆明顯高於 90 及 91 年藥酒成品（2.86~2.00）。

3. 萬應膏、綠云膏的水性及油性藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品 CMC 檢驗

（1）萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之抽取率（%），（n=1）

	第一批	第二批	第三批
萬應膏半製品(水性)	—*	65.34	—*
萬應膏半製品(油性)	18.57	37.79	14.93
萬應膏製品(水性)	70.68	67.68	72.47
萬應膏製品(油性)	17.23	45.90	29.81
綠云膏半製品(水性)	60.48	66.69	56.64
綠云膏半製品(油性)	47.13	36.46	13.46
綠云膏製品(水性)	70.03	65.14	66.96
綠云膏製品(油性)	30.12	29.18	18.88
金門龍鳳藥酒半製品	3.46	3.19	3.07
十全大補藥酒半製品	9.19	10.18	12.7

“—*” 表示委託製造廠商無法提供樣

(2) 萬應膏、綠云膏藥膠布半製品及製品之總灰分(%)，(n=3)

	第一批	第二批	第三批
萬應膏半製品(水性)	—*	5.88± 0.5	—*
萬應膏半製品(油性)	28.23±0.2739	18.93±0.2550	13.16±0.2449
萬應膏製品(水性)	5.41±0.3674	5.265±0.4123	5.62±0.3937
萬應膏製品(油性)	18.28±0.8746	14.84±0.5050	12.75±0.2345
綠云膏半製品(水性)	5.54±0.5089	5.80±0.7842	6.03±0.2121
綠云膏半製品(油性)	15.99±0.3937	20.21±0.4301	18.23±0.2236
綠云膏製品(水性)	5.21±0.5523	5.11±0.3873	5.08±0.1581
綠云膏製品(油性)	13.84±0.5050	16.44±0.2	15.14±0.4690
金門龍鳳藥酒半製品	0.2392±0.1072	0.5669±0.4465	0.1582±0.1892
金門龍鳳藥酒製品	0.1279±0.1207	0.1266±0.1149	0.1357±0.0825
十全大補藥酒半製品	—***	0.2523±0.0671	0.2396±0.2025
十全大補藥酒製品	0.1855±0.1329	0.1153±0.0718	0.1018±0.1196

“—*” 表示委託製造廠商無法提供樣品， “—***” 表示樣品不足

(3) 萬應膏、綠云膏藥膠布半製品及製品之酸不溶性灰分(%)，(n=3)

	第一批	第二批	第三批
萬應膏半製品(水性)	— [*]	1.25±0.5	— [*]
萬應膏半製品(油性)	0.33±0.3162	0.53±0.2828	0.28±0.2550
萬應膏製品(水性)	2.32±0.4743	2.22±0.2828	2.40±0.3808
萬應膏製品(油性)	0.75±0.1	0.28±0.243	0.26±0.2646
綠云膏半製品(水性)	1.98±0.5292	1.66±0.2	2.15±0.5916
綠云膏半製品(油性)	0.0787±0.0213	0.3285±0.3421	0.825±0.5030
綠云膏製品(水性)	2.095±0.3	2.535±0.5568	2.01±0.5701
綠云膏製品(油性)	0.85±0.8124	0.427±0.3217	0.416±0.3564
金門龍鳳藥酒半製品	0.0767±0.1330	0.1027±0.2319	0.0572±0.1915
金門龍鳳藥酒製品	0.0634±0.1052	0.0660±0.0711	0.0466±0.0922
十全大補藥酒半製品	— ^{**}	0.0549±0.0120	0.0451±0.2261
十全大補藥酒製品	0.0454±0.0274	0.0464±0.1517	0.0460±0.1505

“—^{*}” 表示委託製造廠商無法提供樣品，“—^{**}” 表示樣品不足

(4) 萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品之乾燥減重(%)，(n=3)

	第一批	第二批	第三批
萬應膏半製品(水性)	— [*]	0.195±0.1225	— [*]
萬應膏半製品(油性)	0.063±0.1263	0.044±0.0721	0.148±0.1015
萬應膏製品(水性)	0.4289±0.0781	0.4456±0.0574	0.4573±0.0652
萬應膏製品(油性)	0.0226±0.0212	0.0291±0.0259	0.0521±0.0514
綠云膏半製品(水性)	0.295±0.4123	0.270±0.2450	0.21±0.00
綠云膏半製品(油性)	0.1529±0.0394	0.0581±0.1185	0.1328±0.0744
綠云膏製品(水性)	0.5102±0.01	0.487±0.0762	0.5347±0.01
綠云膏製品(油性)	0.0306±0.0293	0.0158±0.0371	0.0107±0.2520

“—^{*}” 表示委託製造廠商無法提供樣品

(5) 萬應膏及綠云膏藥膠布半製品及製品之稀醇抽出物(%)，(n=3)

	第一批	第二批	第三批
萬應膏半製品(水性)	— [*]	8.305±0.7937	— [*]
萬應膏半製品(油性)	0.58±0.1	1.31±0.5477	2.76±0.2828
萬應膏製品(水性)	15.96±1.3638	5.42±0.8544	19.185±0.4123
萬應膏製品(油性)	1.22±0.4796	1.90±0.4359	1.13±1.1747
綠云膏半製品(水性)	9.44±0.8366	9.44±0.6481	5.68±0.5958
綠云膏半製品(油性)	0.66±0.2236	0.57±0.1581	0.68±0.2449
綠云膏製品(水性)	18.35±2.1749	17.91±1.1533	18.94±2.1726
綠云膏製品(油性)	1.8±0.5385	0.91±0.1414	1.37±0.5627
金門龍鳳藥酒半製品	3.46±0.2121	3.19±0.2345	3.07±0.2646
金門龍鳳藥酒製品	31.13±0.6928	32.35±1.0173	27.43±1.3802
十全大補藥酒半製品	9.19±0.1915	10.18±0.7253	10.11±1.0770
十全大補藥酒製品	26.64±1.3838	30.30±0.9354	29.85±1.6386

“—^{*}”表示委託製造廠商無法提供樣品

4. 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之 TLC 指紋圖譜、指標成分檢驗

(1) 萬應膏藥膠布三批藥材之指標成分 TLC 鑑定 (圖 10)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分 R _f 值	第一批藥材甲醇萃取 R _f 值	第二批藥材甲醇萃取 R _f 值	第三批藥材甲醇萃取 R _f 值
川烏	n-BuOH：冰醋酸：水(14：2：1)，Dragendorff	aconitine 0.37 (橙色)	0.34(橙色)	0.37(橙色)	0.36(橙色)
草烏	n-BuOH：冰醋酸：水(14：2：1)，Dragendorff	aconitine 0.35 (橙色)	0.34(橙色)	0.33(橙色)	0.31(橙色)
生地黃	CHCl ₃ ：MeOH (4：1)，30% H ₂ SO ₄	catalpol 0.1 (棕色)	0.09(黑色)	0.08(黑色)	0.08(黑色)
肉桂	Toluene：EtOAc (1：1)，UV254	Cinnamylal-dehyde，0.55 (黑色)	0.52(黑色)	0.52(黑色)	0.56(黑色)
白芷	CHCl ₃ ，UV254	Imperatorin 0.10 (黑色)	0.10(黑色)	0.12(黑色)	0.10(黑色)
當歸	CHCl ₃ ：MeOH (6：1)，UV254	ferulic acid 0.51 (黑色)	0.51(黑色)	0.53(黑色)	0.55(黑色)
赤芍	CHCl ₃ ：MeOH：EtOAc (8：2：1)，30% H ₂ SO ₄	paeoniflorin	0.22(紫紅色)	0.22(紫紅色)	0.22(紫紅色)
羌活	Toluene：EtOAc (1：1)，UV254	isoimperatorin 0.87(黑色)	0.86(黑色)	0.86(黑色)	0.87(黑色)
苦參	CHCl ₃ ：MeOH (4：1)，Dragendorff	oxymatrin 0.13 (橙色)	0.16(橙色)	0.16(橙色)	0.17(橙色)
白薇	n-BuOH：冰醋酸：水(7：1：1)，UV254	無指標成分以各廠家鑑定之藥材的甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物：0.95、0.45、0.23 藥材：0.95、0.45、0.23	甲醇萃取物：0.96、0.44 藥材：0.96、0.44	甲醇萃取物：0.97、0.46 藥材：0.97、0.46

木鱉子	CHCl ₃ ，UV254	無指標成分以各廠家鑑定之藥材的甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物： 0.75、0.13、0.05 藥材：0.73、0.13、0.05	甲醇萃取物： 0.89、0.75、0.68、0.11 藥材：0.89、0.74、0.68、0.10	甲醇萃取物： 0.75、0.58、0.06 藥材：0.75、0.58、0.05
烏藥	CHCl ₃ ：MeOH (9：1)，UV254	無指標成分以各廠家鑑定之藥材的甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物： 0.90、0.76、0.46、0.38 藥材：0.90、0.76、0.46、0.38	甲醇萃取物： 0.92、0.77、0.47、0.34 藥材：0.92、0.75、0.44、0.33	甲醇萃取物： 0.83、0.67、0.39、0.03 藥材：0.83、0.68、0.38、0.04
甘草	n-BuOH：冰醋酸：水(7：2：1)，30% H ₂ SO ₄	glycyrrhizin0.39(紅色)	0.37(紅色)	0.37(紅色)	0.39(紅色)
獨活	CHCl ₃ ，UV254	osthole0.21(藍色螢光)	0.26(藍色螢光)	0.26(藍色螢光)	0.21(藍色螢光)
元參	CHCl ₃ ：EtOAc (1：1)，UV254	Harpagoside 0.53(黑色)	0.52(黑色)	0.53(黑色)	0.52(黑色)
大黃	n-Hexane：EtOAc(4：1)，UV254 或 UV366	emodin0.20(灰色，白光呈淡黃色)	0.19(灰色)	0.23(灰色)	0.20(灰色)

(2) 綠云膏藥膠布三批藥材之指標成分 TLC 鑑定 (圖 11)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分 R _f 值	第一批藥材 甲醇萃取 R _f 值	第二批藥材 甲醇萃取 R _f 值	第三批藥材 甲醇萃取 R _f 值
黃連	n-BuOH：HOAc：H ₂ O、(7：1：1)，UV366	coptisine0.27(金黃色)	0.27(金黃色)	0.27(金黃)	0.27(金黃)
大黃	n-Hexane：EtOAc (4：1) UV254 或 UV366	emodin0.20(灰色，白光呈淡黃色)	0.19(灰色)	0.23(灰色)	0.20(灰色)
黃芩	n-BuOH：HOAc：H ₂ O、(14：1：1)，UV254	baicalin0.20(灰色)	0.20(灰色)	0.21(灰色)	0.20(灰色)
黃柏	n-BuOH：HOAc：H ₂ O、(7：1：2)，UV366	berberine 0.36(金黃色)	0.38(金黃色)	0.38(金黃)	0.42(金黃)
玄參	n-BuOH：HOAc：H ₂ O、(10：0.5：0.5)，UV254	harpagoside 0.53(黑色)	0.52(黑色)	0.53(黑色)	0.52(黑色)
木鱉子	CHCl ₃ ，UV254	無指標成分以各廠家鑑定之藥材的甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物： 0.75、0.13、0.05 藥材：0.73、0.13、0.05	甲醇萃取物：0.92、0.77、0.47、0.34 藥材：0.92、0.75、0.44、0.33	甲醇萃取物： 0.83、0.67、0.39、0.03 藥材：0.83、0.68、0.38、0.04

(3) 金門龍鳳藥酒三批藥材之指標成分 TLC 鑑定 (圖 12)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分 R _f 值	第一批藥材 甲醇萃取 R _f 值	第二批藥材甲 醇萃取 R _f 值	第三批藥材甲 醇萃取 R _f 值
當歸	CHCl ₃ : MeOH (6 : 1), UV254	ferulic acid 0.51(黑色)	0.51(黑色)	0.53(黑色)	0.55(黑色)
五味子	Toluene : EtOAc (9 : 1), UV254	schisandrin ; 0.05(灰色)	0.05(灰色)	0.05(灰色)	0.05(灰色)
山萸肉	Benzene : acetone (9 : 1), 30% H ₂ SO ₄	ursolic acid 0.30(粉紅色)	0.30(粉紅色)	0.30(粉紅色)	0.30(粉紅色)
巴戟天	n-Hexane : EtOAc (4 : 1), UV366	無指標成分以各廠家鑑定之藥材的甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物 : 0.22 藥材 : 0.21	甲醇萃取物 : 0.20 藥材 : 0.20	甲醇萃取物 : 0.11 藥材 : 0.11
肉蓯蓉	n-BuOH : HOAc : H ₂ O、(7 : 2 : 1), UV254	無指標成分以各廠家鑑定之藥材的甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物 : 0.56 藥材 : 0.55	甲醇萃取物 : 0.68 藥材 : 0.68	甲醇萃取物 : 0.65 藥材 : 0.65
肉桂	Toluene : EtOAc (1 : 1), UV254	cinnamylaldehyde, 0.55(黑色)	0.52(黑色)	0.52(黑色)	0.56(黑色)

(4) 十全大補藥酒三批藥材之指標成分 TLC 鑑定 (圖 13)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分 R _f 值	第一批藥材甲 醇萃取 R _f 值	第二批藥材 甲醇萃取 R _f 值	第三批藥材 甲醇萃取 R _f 值
當歸	CHCl ₃ : MeOH (6 : 1), UV254	ferulic acid 0.51(黑色)	0.51(黑色)	0.53(黑色)	0.55(黑色)
川芎	n-Hexane : EtOAc (9 : 1), UV254	無指標成分以甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物 : 0.48、0.27、0.05 藥材 : 0.48、0.26、0.04	甲醇萃取物 : 0.45、0.22、0.06 藥材 : 0.47、0.22、0.06	甲醇萃取物 : 0.31、0.27、0.10 藥材 : 0.34、0.27、0.05
白芍	CHCl ₃ : MeOH : EtOAc (8 : 2 : 1), 30% H ₂ SO ₄	paeoniflorin 0.25(紫紅色)	0.23(紫紅色)	0.23(紫紅色)	0.23(紫紅色)
熟地黃	n-BuOH : HOAc : H ₂ O(7 : 2 : 1), 30% H ₂ SO ₄	無指標成分以甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物 : 0.35 藥材 : 0.35	甲醇萃取物 : 0.41 藥材 : 0.40	甲醇萃取物 : 0.39 藥材 : 0.39
黨參	n-BuOH : HOAc : H ₂ O(14 : 1 : 1), UV254	無指標成分以甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物 : 0.56、0.39 藥材 : 0.56、0.39	甲醇萃取物 : 0.74、0.53、0.45 藥材 : 0.74、0.53、0.46	甲醇萃取物 : 0.79、0.36、0.19 藥材 : 0.79、0.36、0.19
茯苓	CHCl ₃ : MeOH (9 : 1), UV254	無指標成分以甲醇萃取物當指標成分	甲醇萃取物 : 0.80、0.74、0.60 藥材 : 0.79、0.74、0.65、0.56	甲醇萃取物 : 0.60、0.55、0.40 藥材 : 0.64、0.59、0.39	甲醇萃取物 : 0.77、0.68、0.50 藥材 : 0.71、0.61、0.45
白朮	CHCl ₃ : MeOH : EtOAc、(8 : 5 : 2),	無指標成分以甲醇萃取物	甲醇萃取物 : 0.91、0.80、	甲醇萃取物 : 0.91、0.79、	甲醇萃取物 : 0.91、0.80、0.41

	30% H ₂ SO ₄	當指標成分	0.41、0.17 藥材：0.91、 0.80、0.41、0.17	0.31 藥材： 0.91、0.80、 0.29	藥材：0.91、 0.80、0.41
甘草	n-BuOH：HOAc ：H ₂ O(7：2：1)， 30% H ₂ SO ₄	glycyrrhizin0.39(紅色)	0.37(紅色)	0.37(紅色)	0.39(紅色)
肉桂	n-Hexane：EtOAc (4：1)，UV254	cinnamylaldehyde，0.55 (黑色)	0.52(黑色)	0.52(黑色)	0.56(黑色)
黃耆	CHCl ₃ ：MeOH (9： 1)、UV254	calycosin0.55(黑色)	0.48(黑色)	0.48(黑色)	0.48(黑色)

(5) 萬應膏油性藥膠布半製品及製品各三批之指紋圖譜 TLC 鑑定 (圖 14)

展開溶媒 CHCl ₃ ：MeOH (9：1)	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
半製品	於 0.72、0.60、0.40、0.33、 0.22 處有黑點	於 0.52、0.30、0.24、0.15 處有黑點	於 0.67、0.55、0.36、0.29、 0.18 處有黑點
製品	於 0.71、0.55、0.36、0.29、 0.18 處有黑點	於 0.55、0.36、0.29 處有黑點	於 0.68、0.56、0.38、0.31、 0.21 處有黑點

(6) 萬應膏水性藥膠布半製品及製品各三批之指紋圖譜 TLC 鑑定 (圖 15)

展開溶媒 CHCl ₃ ：MeOH (9：1)	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
半製品	—	於 0.76、0.70、0.49、0.24、 0.17 處有黑點	—
製品	於 0.79、0.72、0.59、0.39、 0.32、0.20 處有黑點	於 0.76、0.70、0.48、0.24、 0.16 處有黑點	於 0.76、0.67、0.46、0.37、 0.31 處有黑點

“—” 表示委託製造廠商無法提供樣品

(7) 綠云膏油性藥膠布半製品及製品各三批之指紋圖譜 TLC 鑑定 (圖 16)

展開溶媒 CHCl ₃ ：MeOH (9：1)	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
半製品	於 0.36、0.30、0.18、0.05 處有黑點	於 0.42、0.31、0.21、0.06 處有黑點	於 0.33、0.16、0.05 處有黑點
製品	於 0.41、0.33、0.22、0.08 處有黑點	於 0.37、0.29、0.19、0.07 處有黑點	於 0.38、0.20、0.06 處有黑點

(8) 綠云膏水性藥膠布半製品及製品各三批之指紋圖譜 TLC 鑑定 (圖 17)

展開溶媒 CHCl ₃ : MeOH (9 : 1)	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
半製品	於 0.79、0.74、 0.44、0.37、0.23、 0.10 處有黑點	於 0.58、0.55、 0.33、0.03 處有黑點	於 0.86、0.81、 0.41、0.34、0.22、 0.08 處有黑點
製品	於 0.83、0.76、 0.42、0.35、0.22、 0.09 處有黑點	於 0.63、0.58、 0.35、0.03 處有黑點	於 0.86、0.81、 0.42、0.36、0.22、 0.10 處有黑點

(9) 金門龍鳳藥酒半製品及製品各三批之指紋圖譜 TLC 鑑定 (圖 18)

展開溶媒 CHCl ₃ : MeOH (9 : 1)	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
半製品	於 0.95、0.87、 0.43、0.26、0.11、 0.07 處有黑點	於 0.35、0.27、 0.15、0.11、0.07 處有黑點	於 0.91、0.82、 0.41、0.28、0.07 處有黑點
製品	於 0.41、0.28、 0.13、0.09 處有黑點	於 0.71、0.48、 0.27、0.15、0.07 處有黑點	於 0.41、0.31、0.11 處有黑點

(10) 十全大補藥酒半製品及製品各三批之指紋圖譜 TLC 鑑定 (圖 19)

展開溶媒 CHCl ₃ : MeOH (9 : 1)	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
半製品	於 0.87、0.71、 0.51、0.31、0.28、 處有黑點	於 0.74、0.39、0.33 處有黑點	於 0.77、0.59、 0.34、0.29 處有黑點
製品	於 0.52、0.34、 0.32、0.28 處有黑點	於 0.49、0.41、0.35 處有黑點	於 0.57、0.43、 0.36、0.31 處有黑點

(11) 萬應膏油性藥膠布半製品及製品各三批之指標成分 TLC 檢驗 (圖 20)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
肉桂	Toluene : EtOAc (4 : 1) , UV254	cinnamic acid	指標成分 : 0.06(黑色) 半製品 : 0.06(黑色) 製品 : 0.06(黑色)	指標成分 : 0.07 (黑色) 半製品 : 0.07(黑色) 製品 : 0.07(黑色)	指標成分 : 0.07 (黑色) 半製品 : 0.07(黑色) 製品 : 0.07(黑色)

白芷	CHCl ₃ UV254	imperatorin	指標成分：0.36(黑色) 半製品：0.33(黑色) 製品：0.34(黑色)	指標成分：0.34 (黑色) 半製品：0.34(黑色) 製品：0.34(黑色)	指標成分：0.31 (黑色) 半製品：0.31(黑色) 製品：0.31(黑色)
當歸	CHCl ₃ ：MeOH (6：1) UV254	ferulic acid	指標成分：0.71(黑色) 半製品：0.66(黑色) 製品：0.68(黑色)	指標成分：0.49 (黑色) 半製品：0.46(黑色) 製品：0.48(黑色)	指標成分：0.51 (黑色) 半製品：0.56(黑色) 製品：0.52(黑色)
赤芍	CHCl ₃ ：MeOH ：EtOAc (8：2：1) 30% H ₂ SO ₄	paeoniflorin	指標成分：0.23(粉紅色) 半製品：0.22(粉紅色) 製品：0.20(粉紅色)	指標成分：0.22 (粉紅色) 半製品：0.21(粉紅色) 製品：0.21(粉紅色)	指標成分：0.24 (粉紅色) 半製品：0.24(粉紅色) 製品：0.25(粉紅色)
羌活	Toluene：EtOAc (1：1) UV254	Isoimperatorin	指標成分：0.59(黑色) 半製品：0.58(黑色) 製品：0.59(黑色)	指標成分：0.56 (黑色) 半製品：0.56(黑色) 製品：0.56(黑色)	指標成分：0.59 (黑色) 半製品：0.59(黑色) 製品：0.59(黑色)
獨活	CHCl ₃ UV254	osthole	指標成分：0.41(藍色 螢光) 半製品：0.35(藍色螢 光) 製品：0.35(藍色螢光)	指標成分：0.35 (藍色螢光色) 半製品：0.35(藍色 螢光色) 製品：0.39(藍色螢 光色)	指標成分：0.42 (藍色螢光色) 半製品：0.42(藍色 螢光色) 製品：0.40(藍色螢 光色)
大黃	n-Hexane：EtOAc (4：1) UV254	emodin	指標成分：0.21(黑色) 半製品：0.21(黑色) 製品：0.21(黑色)	指標成分：0.20 (黑色) 半製品：0.20(黑色) 製品：0.19(黑色)	指標成分：0.22 (黑色) 半製品：0.21(黑色) 製品：0.21(黑色)

(12) 萬應膏水性藥膠布半製品及製品各三批之指標成分 TLC 檢驗 (圖 21)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
肉桂	Toluene：EtOAc (4：1)，UV254	cinnamic acid	指標成分：0.04(黑 色) 製品：0.06(黑色)	指標成分：0.07 (黑色) 半製品：0.07(黑色) 製品：0.07(黑色)	指標成分：0.07 (黑色) 製品：0.07(黑色)
白芷	CHCl ₃ UV254	imperatorin	指標成分：0.35(黑 色) 製品：0.33(黑色)	指標成分：0.30 (黑色) 半製品：0.34(黑色) 製品：0.33(黑色)	指標成分：0.36 (黑色) 製品：0.38(黑色)

當歸	CHCl ₃ : MeOH (6 : 1) UV254	ferulic acid	指標成分 : 0.59(黑色) 製品 : 0.56(黑色)	指標成分 : 0.45(黑色) 半製品 : 0.45(黑色) 製品 : 0.44(黑色)	指標成分 : 0.44(黑色) 製品 : 0.44(黑色)
羌活	Toluene : EtOAc (1 : 1) UV254	Isoimperatorin	指標成分 : 0.84(黑色) 製品 : 0.85(黑色)	指標成分 : 0.88(黑色) 半製品 : 0.90(黑色) 製品 : 0.91(黑色)	指標成分 : 0.84(黑色) 製品 : 0.84(黑色)
獨活	CHCl ₃ UV254	osthole	指標成分 : 0.39(藍色螢光) 製品 : 0.38(藍色螢光)	指標成分 : 0.36(藍色螢光色) 半製品 : 0.32(藍色螢光色) 製品 : 0.30(藍色螢光色)	指標成分 : 0.35(藍色螢光色) 製品 : 0.41(藍色螢光色)

(13) 綠云膏油性藥膠布半製品及製品各三批之指標成分 TLC 檢驗 (圖 22)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
黃連	n-BuOH : HOAc : H ₂ O (7 : 1 : 1) UV366	coptisine 0.27(金黃色)	指標成分 : 0.38(金黃色) 半製品 : 0.36(金黃色) 製品 : 0.36(金黃色)	指標成分 : 0.35(金黃色) 半製品 : 0.34(金黃色) 製品 : 0.34(金黃色)	指標成分 : 0.41(金黃色) 半製品 : 0.41(金黃色) 製品 : 0.42(金黃色)
大黃	n-Hexane : EtOAc (4 : 1) UV366	emodin	指標成分 : 0.29(淡橙色) 半製品 : 0.28(淡橙色) 製品 : 0.28(淡橙色)	指標成分 : 0.19(淡橙色) 半製品 : 0.19(淡橙色) 製品 : 0.20(淡橙色)	指標成分 : 0.24(淡橙色) 半製品 : 0.26(淡橙色) 製品 : 0.25(淡橙色)
黃柏	n-BuOH : HOAc : H ₂ O (7 : 1 : 2) , UV366	berberine 0.36(金黃色)	指標成分 : 0.46(金黃色) 半製品 : 0.43(金黃色) 製品 : 0.41(金黃色)	指標成分 : 0.36(金黃色) 半製品 : 0.37(金黃色) 製品 : 0.39(金黃色)	指標成分 : 0.46(金黃色) 半製品 : 0.45(金黃色) 製品 : 0.45(金黃色)

(14) 綠云膏水性藥膠布半製品及製品各三批之指標成分 TLC 檢驗 (圖 23)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
黃連	n-BuOH : HOAc : H ₂ O (7 : 1 : 1)	coptisine	指標成分 : 0.38(金黃色) 半製品 : 0.38(金黃色)	指標成分 : 0.35(金黃色) 半製品 : 0.35(金黃色)	指標成分 : 0.35(金黃色) 製品 : 0.34(金黃色)

	UV366		色) 製品：0.39(金黃色)	黃色) 製品：0.36(金黃色)	色)
大黃	n-Hexane： EtOAc (4：1) UV366	emodin	指標成分：0.25(淡 橙色) 半製品：0.25(淡橙 色) 製品：0.26(淡橙色)	指標成分：0.18 (淡橙色) 半製品：0.18(淡 橙色) 製品：0.19(淡橙 色)	指標成分：0.21 (淡橙色) 半製品：0.20(淡 橙色) 製品：0.21(淡橙 色)
黃柏	n-BuOH： HOAc：H ₂ O (7：1：2)， UV366	berberine	指標成分：0.45(金 黃色) 半製品：0.41(金黃 色)製品：0.43(金黃 色)	指標成分：0.46 (金黃色) 半製品：0.44(金 黃色) 製品：0.45(金黃 色)	指標成分：0.47 (金黃色) 半製品：0.44(金 黃色) 製品：0.45(金黃 色)

(15) 金門龍鳳藥酒半製品三批之指標成分 TLC 檢驗 (圖 24)

藥材名稱	展開溶媒及 呈色法	指標成分	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
山萸肉	Benzene： acetone (9：1)， 30% H ₂ SO ₄	ursolic acid	指標成分：0.27(粉 紅色) 半製品：0.27(粉紅 色)	指標成分：0.27 (粉紅色) 半製品：0.27(粉 紅色)	指標成分：0.27 (粉紅色) 半製品：0.27(粉 紅色)

(16) 金門龍鳳藥酒製品三批之指標成分 TLC 檢驗 (圖 25)

藥材名稱	展開溶媒及 呈色法	指標成分	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
五味子	Toluene： EtOAc (9：1) UV254	schisandrin	指標成分： 0.06(灰色) 製品：0.07(灰色)	指標成分：0.06 (灰色) 製品：0.07(灰色)	指標成分：0.06 (灰色) 製品：0.07(灰色)
山萸肉	Benzene： acetone (9： 1)，30% H ₂ SO ₄	ursolic acid	指標成分： 0.06(粉紅色) 製品：0.07(粉紅 色)	指標成分：0.21 (粉紅色) 製品：0.21(粉紅 色)	指標成分：0.21 (粉紅色) 製品：0.21(粉紅 色)

(17) 十全大補藥酒半製品三批之指標成分 TLC 檢驗 (圖 26)

藥材名稱	展開溶媒及 呈色法	指標成分	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
當歸	CHCl ₃ ：MeOH (6：1) UV254	ferulic acid 0.51(黑色)	指標成分： 0.71(黑色) 半製品：0.66(黑 色)	指標成分：0.65 (黑色) 半製品：0.66(黑 色)	指標成分：0.63 (黑色) 半製品：0.65(黑 色)
川芎	n-Hexane：	無指標成分	指標成分：0.45、	指標成分：0.43	指標成分：0.41

	EtOAc (9 : 1) UV254		0.25(黑色) 半製品 : 0.46、 0.25(黑色)	、0.22(黑色) 半製品 : 0.45、 0.23(黑色)	、0.22(黑色) 半製品 : 0.40、 0.22(黑色)
白芍	CHCl ₃ : MeOH : EtOAc (8 : 2 : 1) 30% H ₂ SO ₄	paeoniflorin	指標成分 : 0.26(紫紅色) 半製品 : 0.26(紫 紅色)	指標成分 : 0.26 (紫紅色) 半製品 : 0.26(紫 紅色)	指標成分 : 0.26 (紫紅色) 半製品 : 0.26(紫 紅色)
甘草	n-BuOH : HOAc : H ₂ O (7 : 2 : 1) 30% H ₂ SO ₄	glycyrrhizin	指標成分 : 0.51(棕色) 半製品 : 0.52(棕 色)	指標成分 : 0.51 (棕色) 半製品 : 0.51(棕 色)	指標成分 : 0.51 (棕色) 半製品 : 0.51(棕 色)
肉桂	n-Hexane : EtOAc (4 : 1) UV254	cinnamylal- dehyde	指標成分 : 0.60(黑色) 半製品 : 0.58(黑 色)	指標成分 : 0.57 (黑色) 半製品 : 0.57(黑 色)	指標成分 : 0.56 (黑色) 半製品 : 0.56(黑 色)
黃耆	CHCl ₃ : MeOH (9 : 1) UV254	calycosin	指標成分 : 0.14(黑色) 半製品 : 0.13(黑 色)	指標成分 : 0.14 (黑色) 半製品 : 0.14(黑 色)	指標成分 : 0.60 (黑色) 半製品 : 0.60(黑 色)

(18) 十全大補藥酒製品三批之指標成分 TLC 檢驗 (圖 27)

藥材名稱	展開溶媒及呈色法	指標成分	第一批 R _f 值	第二批 R _f 值	第三批 R _f 值
川芎	n-Hexane : EtOAc (9 : 1) UV254	無指標成分	指標成分 : 0.41、 0.22(黑色) 半製品 : 0.41、 0.22(黑色)	指標成分 : 0.40 、0.21(黑色) 半製品 : 0.42、 0.22(黑色)	指標成分 : 0.41 、0.22(黑色) 半製品 : 0.39、 0.21(黑色)
白芍	CHCl ₃ : MeOH : EtOAc (8 : 2 : 1) 30% H ₂ SO ₄	paeoniflorin	指標成分 : 0.40(紫紅色) 半製品 : 0.39(紫 紅色)	指標成分 : 0.40 (紫紅色) 半製品 : 0.40(紫 紅色)	指標成分 : 0.40 (紫紅色) 半製品 : 0.40(紫紅色)
甘草	n-BuOH : HOAc : H ₂ O (7 : 2 : 1) 30% H ₂ SO ₄	glycyrrhizin	指標成分 : 0.38(棕色) 半製品 : 0.38(棕 色)	指標成分 : 0.38 (棕色) 半製品 : 0.38(棕 色)	指標成分 : 0.38 (棕色) 半製品 : 0.38(棕色)
肉桂	n-Hexane : EtOAc (4 : 1) UV254	cinnamylal- dehyde	指標成分 : 0.54(黑色) 半製品 : 0.52(黑 色)	指標成分 : 0.54 (黑色) 半製品 : 0.53(黑 色)	指標成分 : 0.54 (黑色) 半製品 : 0.54(黑色)

4. 萬應膏、綠云膏藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒半製品及製品之 HPLC 指紋圖譜、指標成分定量

一、金門龍鳳酒

(一) 藥材之分析

1. 五味子

- (1) 指標成分：schizandrin、gomisin A。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：schizandrin 為 55.48 分；gomisin A 為 59.08 分（圖 28）。
- (3) 定量結果：schizandrin 之含量為 $2517.35 \pm 33.52 \mu\text{g/g}$ ；gomisin A 之含量為 $1347.93 \pm 48.43 \mu\text{g/g}$ 。

2. 山萸肉

- (1) 指標成分：loganin。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：loganin 為 16.08 分（圖 29）。
- (3) 定量結果：loganin 之含量為 $3336.07 \pm 90.22 \mu\text{g/g}$ 。

3. 肉桂

- (1) 指標成分：cinnamic acid、cinnamaldehyde。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：cinnamic acid 為 43.69 分；cinnamaldehyde 為 46.28 分（圖 30）。
- (3) 定量結果：cinnamic acid 之含量為 $132.37 \pm 6.80 \mu\text{g/g}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $807.29 \pm 1.41 \mu\text{g/g}$ 。

4. 當歸

- (1) 指標成分：scopoletin、ferulic acid。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：scopoletin 為 27.67 分；ferulic acid 為 30.79 分（圖 31）。
- (3) 定量結果：scopoletin 之含量為 $1157.503 \pm 57.21 \mu\text{g/g}$ ；ferulic acid 之含量為 $178.95 \pm 50.00 \mu\text{g/g}$ 。

5. 巴戟天

- (1) 指標成分：無。
- (2) HPLC 層析圖：指紋圖譜（圖 32）。

6. 肉蓯蓉

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 33)。

(二) 金門龍鳳酒半成品

1. 指標成分：loganin、scopoletin、ferulic acid、cinnamic acid、cinnamaldehyde、schizandrin、gomisin A。

2. HPLC 層析圖之滯留時間：loganin 為 16.08 分；scopoletin 為 27.67 分；ferulic acid 為 30.79 分；cinnamic acid 為 43.69 分；cinnamaldehyde 為 46.28 分；schizandrin 為 55.48 分；gomisin A 為 59.08 分 (圖 34~36)。

3. 定量結果：

(1) 一個月：loganin 之含量為 $123.68 \pm 11.45 \mu\text{g/mL}$ ；scopoletin 之含量為 $12.05 \pm 13.84 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $12.09 \pm 57.56 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $22.98 \pm 61.71 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $38.26 \pm 28.04 \mu\text{g/mL}$ ；schizandrin 之含量為 $36.35 \pm 5.25 \mu\text{g/mL}$ ；gomisin A 之含量為 $15.38 \pm 4.05 \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 二個月：loganin 之含量為 $129.99 \pm 3.12 \mu\text{g/mL}$ ；scopoletin 之含量為 $12.62 \pm 13.90 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $12.32 \pm 66.74 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $24.12 \pm 59.08 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $66.99 \pm 84.46 \mu\text{g/mL}$ ；schizandrin 之含量為 $47.82 \pm 6.22 \mu\text{g/mL}$ ；gomisin A 之含量為 $17.34 \pm 16.08 \mu\text{g/mL}$ 。

(3) 三個月：loganin 之含量為 $133.25 \pm 6.47 \mu\text{g/mL}$ ；scopoletin 之含量為 $12.51 \pm 10.38 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $13.55 \pm 69.48 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $24.16 \pm 62.07 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $62.19 \pm 74.85 \mu\text{g/mL}$ ；schizandrin 之含量為 $51.00 \pm 15.52 \mu\text{g/mL}$ ；gomisin A 之含量為 $19.39 \pm 26.83 \mu\text{g/mL}$ 。

(三) 金門龍鳳酒成品

1. 指標成分：loganin、scopoletin、ferulic acid、cinnamic acid、cinnamaldehyde、schizandrin、gomisin A。

2. HPLC 層析圖之滯留時間：loganin 為 16.08 分；scopoletin 為 27.67 分；ferulic acid 為 30.79 分；cinnamic acid 為 43.69 分；cinnamaldehyde 為 46.28 分；schizandrin 為 55.48 分；gomisin A 為 59.08 分 (圖 37)。

3. 定量結果：loganin 之含量為 $0.38 \pm 18.63 \mu\text{g/mL}$ ；scopoletin 之含量為 $2.33 \pm 20.65 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $3.13 \pm 42.16 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量無法偵測；cinnamaldehyde 之含量為 $15.77 \pm 39.43 \mu\text{g/mL}$ ；schizandrin 之含量為 $13.21 \pm 18.14 \mu\text{g/mL}$ ；gomisin A 之含量為 $4.94 \pm 36.26 \mu\text{g/mL}$ 。

二、十全大補藥酒

(一) 藥材之分析

1. 當歸

- (1) 指標成分：ferulic acid。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：ferulic acid 為 16.60 分 (圖 38)。
- (3) 定量結果：ferulic acid 之含量為 $1137.94 \pm 13.77 \mu\text{g/g}$ 。

2. 川芎

- (1) 指標成分：ferulic acid。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：ferulic acid 為 16.60 分 (圖 39)。
- (3) 定量結果：ferulic acid 之含量為 $2435.25 \pm 5.23 \mu\text{g/g}$ 。

3. 白芍

- (1) 指標成分：paeoniflorin。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：paeoniflorin 為 9.82 分 (圖 40)。
- (3) 定量結果：paeoniflorin 之含量為 $38096.77 \pm 79.17 \mu\text{g/g}$ 。

4. 甘草

- (1) 指標成分：glycyrrhizin。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：glycyrrhizin 為 58.53 分 (圖 41)。
- (3) 定量結果：glycyrrhizin 之含量為 $16438.50 \pm 46.06 \mu\text{g/g}$ 。

5. 肉桂

- (1) 指標成分：cinnamic acid、cinnamaldehyde。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：cinnamic acid 為 42.03 分；cinnamaldehyde 為 47.53 分 (圖 42)。
- (3) 定量結果：cinnamic acid 之含量為 $4710.79 \pm 9.35 \mu\text{g/g}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $12419.09 \pm 21.77 \mu\text{g/g}$ 。

6. 黃耆

- (1) 指標成分：calycosin。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：calycosin 為 38.79 分 (圖 43)。
- (3) 定量結果：calycosin 之含量為 $16.57 \pm 46.63 \mu\text{g/g}$ 。

7. 熟地黃

- (1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 44)。

8. 黨參

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 45)。

9. 茯苓

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 46)。

10. 白朮

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 47)。

(二) 十全大補藥酒半成品

1. 指標成分：paeoniflorin、ferulic acid、cinnamic acid、cinnamaldehyde、calycosin、glycyrrhizin。

2. HPLC 層析圖之滯留時間：paeoniflorin 為 9.82 分；ferulic acid 為 16.60 分；cinnamic acid 為 42.03 分；cinnamaldehyde 為 47.53 分；calycosin 為 38.79 分；glycyrrhizin 為 58.53 分 (圖 48~50)。

3. 定量結果：

(1) 一個月：paeoniflorin 之含量為 $529.75 \pm 54.44 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $113.68 \pm 21.06 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $26.31 \pm 61.71 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $339.63 \pm 20.21 \mu\text{g/mL}$ ；calycosin 之含量為 $31.82 \pm 88.34 \mu\text{g/mL}$ ；glycyrrhizin 之含量為 $1237.78 \pm 20.60 \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 二個月：paeoniflorin 之含量為 $566.10 \pm 55.92 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $122.51 \pm 11.6 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $30.29 \pm 88.45 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $302.37 \pm 13.02 \mu\text{g/mL}$ ；calycosin 之含量為 $31.94 \pm 68.82 \mu\text{g/mL}$ ；glycyrrhizin 之含量為 $1099.36 \pm 13.30 \mu\text{g/mL}$ 。

(3) 三個月：paeoniflorin 之含量為 $577.57 \pm 58.70 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $124.04 \pm 14.53 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $34.73 \pm 33.31 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $298.19 \pm 22.18 \mu\text{g/mL}$ ；calycosin 之含量為 $33.93 \pm 80.26 \mu\text{g/mL}$ ；glycyrrhizin 之含量為 $1083.83 \pm 22.67 \mu\text{g/mL}$ 。

(三) 十全大補藥酒成品

1. 指標成分：paeoniflorin、ferulic acid、cinnamic acid、cinnamaldehyde、calycosin、glycyrrhizin。
2. HPLC 層析圖之滯留時間：paeoniflorin 為 9.82 分；ferulic acid 為 16.60 分；cinnamic acid 為 42.03 分；cinnamaldehyde 為 47.53 分；calycosin 為 38.79 分；glycyrrhizin 為 58.53 分（圖 51）。
3. 定量結果：paeoniflorin 之含量為 $153.61 \pm 22.17 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $31.50 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $4.88 \pm 96.87 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $14.69 \pm 54.86 \mu\text{g/mL}$ ；calycosin 之含量為 $7.04 \pm 3.49 \mu\text{g/mL}$ ；glycyrrhizin 之含量為 $330. \pm 156.15 \mu\text{g/mL}$ 。

三、萬應膏

(一) 藥材之分析

1. 赤芍藥

- (1) 指標成分：paeoniflorin。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：paeoniflorin 為 14.56 分（圖 52）。
- (3) 定量結果：paeoniflorin 之含量為 $18050 \pm 10.06 \mu\text{g/g}$ 。

2. 當歸

- (1) 指標成分：ferulic acid。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：ferulic acid 為 23.41 分（圖 53）。
- (3) 定量結果：ferulic acid 之含量為 $95.32 \pm 18.04 \mu\text{g/g}$ 。

3. 大黃

- (1) 指標成分：sennoside B、sennoside A、emodin。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：sennoside B 為 31.82 分；sennoside A 為 38.11 分；emodin 為 94.38 分（圖 54）。
- (3) 定量結果：sennoside B 之含量為 $27.68 \pm 58.76 \mu\text{g/g}$ ；sennoside A 之含量為 $14.30 \pm 55.48 \mu\text{g/g}$ ；emodin 之含量為 $219.18 \pm 149.61 \mu\text{g/g}$ 。

4. 川烏

(1) 指標成分：aconitine。

(2) HPLC 層析圖之滯留時間：aconitine 為 42.92 分 (圖 55)。

(3) 定量結果：aconitine 之含量為 $27.72 \pm 53.87 \mu\text{g/g}$ 。

5. 草烏

(1) 指標成分：aconitine。

(2) HPLC 層析圖之滯留時間：aconitine 為 42.92 分 (圖 56)。

(3) 定量結果：aconitine 之含量為 $24.25 \pm 42.67 \mu\text{g/g}$ 。

6. 元蓼

(1) 指標成分：harpagoside。

(2) HPLC 層析圖之滯留時間：harpagoside 為 52.73 分 (圖 57)。

(3) 定量結果：harpagoside 之含量為 $100.66 \pm 149.77 \mu\text{g/g}$ 。

7. 肉桂

(1) 指標成分：cinnamic acid、cinnamaldehyde。

(2) HPLC 層析圖之滯留時間：cinnamic acid 為 53.82 分；
cinnamaldehyde 為 57.77 分 (圖 58)。

(3) 定量結果：cinnamic acid 之含量為 $189.55 \pm 57.92 \mu\text{g/g}$ ；
cinnamaldehyde 之含量為 $332.73 \pm 98.92 \mu\text{g/g}$ 。

8. 甘草

(1) 指標成分：glycyrrhizin。

(2) HPLC 層析圖之滯留時間：glycyrrhizin 為 75.23 分 (圖 59)。

(3) 定量結果：glycyrrhizin 之含量為 $184.41 \pm 34.62 \mu\text{g/g}$ 。

9. 白芷

(1) 指標成分：isoimperatorin。

(2) HPLC 層析圖之滯留時間：isoimperatorin 為 106.02 分 (圖 60)。

(3) 定量結果：isoimperatorin 之含量為 $531.84 \pm 44.33 \mu\text{g/g}$ 。

10. 羌活

(1) 指標成分：isoimperatorin。

(2) HPLC 層析圖之滯留時間：isoimperatorin 為 106.02 分 (圖 61)。

(3) 定量結果：isoimperatorin 之含量為 $3571.67 \pm 81.40 \mu\text{g/g}$ 。

11. 生地黃

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 62)。

12. 白薺

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 63)。

13. 白芨

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 64)。

14. 苦參

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 65)。

15. 烏藥

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 66)。

16. 獨活

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 67)。

17. 木鱉子

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 68)。

(二) 萬應膏半成品

1. 指標成分：paeoniflorin、ferulic acid、sennoside B、sennoside A、aconitine、harpagoside、cinnamic acid、cinnamaldehyde、glycyrrhizin、emodin、isoimperatorin。

2. HPLC 層析圖之滯留時間：paeoniflorin 為 14.56 分；ferulic acid 為 23.41 分；sennoside B 為 31.82 分；sennoside A 為 38.11 分；aconitine 為 42.92 分；harpagoside 為 52.73 分；cinnamic acid 為 53.82 分；cinnamaldehyde 為 57.77 分；glycyrrhizin 為 75.23 分；emodin 為 94.38 分；isoimperatorin 為 106.02 分 (圖 69~70)。

3. 定量結果：

(1) 油性：paeoniflorin 之含量為 $2582 \pm 78.17 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $31.69 \pm 86.06 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside B 之含量為 $0.05 \pm 53.70 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside A 之含量為 $314.42 \pm 152.30 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $83.46 \pm 59.32 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $11.89 \pm 168.52 \mu\text{g/mL}$ ；glycyrrhizin 之含量為 $19.24 \pm 55.50 \mu\text{g/mL}$ ；emodin 之含量為 $135.21 \pm 30.72 \mu\text{g/mL}$ ；isoimperatorin 之含量為 $91.80 \pm 38.93 \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 水性：paeoniflorin 之含量為 $131.73 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $3.62 \pm \mu\text{g/mL}$ ；sennoside B 之含量為 $0.01 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside A 之含量為 $6.19 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $60.80 \mu\text{g/mL}$ ；glycyrrhizin 之含量為 $10.75 \mu\text{g/mL}$ ；emodin 之含量為 $126.32 \mu\text{g/mL}$ 。

(三) 萬應膏成品

1. 指標成分：paeoniflorin、ferulic acid、sennoside B、sennoside A、aconitine、harpagoside、cinnamic acid、cinnamaldehyde、glycyrrhizin、emodin、isoimperatorin。

2. HPLC 層析圖之滯留時間：paeoniflorin 為 14.56 分；ferulic acid 為 23.41 分；sennoside B 為 31.82 分；sennoside A 為 38.11 分；aconitine 為 42.92 分；harpagoside 為 52.73 分；cinnamic acid 為 53.82 分；cinnamaldehyde 為 57.77 分；glycyrrhizin 為 75.23 分；emodin 為 94.38 分；isoimperatorin 為 106.02 分（圖 71~72）。

3. 定量結果：

(1) 油性：paeoniflorin 之含量為 $4923.14 \pm 44.99 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $114.91 \pm 52.35 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside B 之含量為 $0.09 \pm 96.76 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside A 之含量為 $76.90 \pm 59.93 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $237.86 \pm 49.45 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 之含量為 $23.20 \pm 165.70 \mu\text{g/mL}$ ；glycyrrhizin 之含量為 $40.69 \pm 22.86 \mu\text{g/mL}$ ；emodin 之含量為 $107.24 \pm 43.11 \mu\text{g/mL}$ ；isoimperatorin 之含量為 $82.13 \pm 23.51 \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 水性：paeoniflorin 之含量為 $3385.73 \pm 40.60 \mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 之含量為 $79.02 \pm 41.57 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside B 之含量為 $0.06 \pm 21.29 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside A 之含量為 $104.17 \pm 21.23 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 之含量為 $163.31 \pm 46.66 \mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde

之含量為 $12.85 \pm 137.06 \mu\text{g/mL}$; glycyrrhizin 之含量為 $106.28 \pm 52.11 \mu\text{g/mL}$; emodin 之含量為 $159.31 \pm 22.17 \mu\text{g/mL}$; isoimperatorin 之含量為 $84.06 \pm 30.91 \mu\text{g/mL}$ 。

四、綠云膏

(一) 藥材之分析

1. 黃柏

- (1) 指標成分：coptisine、berberine。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：coptisine 為 42.02 分；berberine 為 70.01 分 (圖 73)。
- (3) 定量結果：coptisine 之含量為 $669.43 \pm 4.13 \mu\text{g/g}$ ；berberine 之含量為 $519.50 \pm 34.39 \mu\text{g/g}$ 。

2. 黃連

- (1) 指標成分：coptisine、berberine。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：coptisine 為 42.02 分；berberine 為 70.01 分 (圖 74)。
- (3) 定量結果：coptisine 之含量為 $1038.07 \pm 54.05 \mu\text{g/g}$ ；berberine 之含量為 $871.27 \pm 18.44 \mu\text{g/g}$ 。

3. 黃芩

- (1) 指標成分：baicalin；baicalein。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：baicalin 為 86.99 分；baicalein 為 103.12 分 (圖 75)。
- (3) 定量結果：baicalin 之含量為 $588.50 \pm 45.02 \mu\text{g/g}$ ；baicalein 之含量為 $1418.33 \pm 43.57 \mu\text{g/g}$ 。

4. 大黃

- (1) 指標成分：sennoside A、emodin。
- (2) HPLC 層析圖之滯留時間：sennoside A 為 67.22 分；emodin 為 114.16 分 (圖 76)。
- (3) 定量結果：sennoside A 之含量為 $2163.27 \pm 48.96 \mu\text{g/g}$ ；emodin 之含量為 $551.99 \pm 54.50 \mu\text{g/g}$ 。

5. 元蓼

- (1) 指標成分：harpagoside。

(2) HPLC 層析圖之滯留時間：harpagoside 為 89.97 分 (圖 77)。

(3) 定量結果：harpagoside 之含量為 $43.09 \pm 46.96 \mu\text{g/g}$ 。

6. 木鱉子

(1) 指標成分：無。

(2) HPLC 層析圖：指紋圖譜 (圖 78)。

(二) 綠云膏半成品

1. 指標成分：coptisine、berberine、sennoside A、baicalin、harpagoside、baicalein、emodin。

2. HPLC 層析圖之滯留時間：coptisine 為 42.02 分；berberine 為 70.01 分；sennoside A 為 67.72 分；baicalin 為 86.99 分；harpagoside 為 89.97 分；baicalein 為 103.12 分；emodin 為 114.16 分 (圖 79~80)。

3. 定量結果：

(1) 油性：coptisine 之含量為 $107.23 \pm 76.25 \mu\text{g/mL}$ ；berberine 之含量為 $2.65 \pm 44.23 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside A 之含量為 $14.97 \pm 54.47 \mu\text{g/mL}$ ；baicalin 之含量為 $63.02 \mu\text{g/mL}$ ；baicalein 之含量為 $77.19 \mu\text{g/mL}$ ；emodin 之含量為 $38.38 \pm 26.55 \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 水性：coptisine 之含量為 $30.01 \pm 27.34 \mu\text{g/mL}$ ；berberine 之含量為 $0.38 \pm 60.94 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside A 之含量為 $9.89 \pm 41.25 \mu\text{g/mL}$ ；baicalin 之含量為 $39.59 \pm 72.51 \mu\text{g/mL}$ ；baicalein 之含量為 $15.35 \pm 50 \mu\text{g/mL}$ 。

(三) 綠云膏成品

1. 指標成分：coptisine、berberine、sennoside A、baicalin、harpagoside、baicalein、emodin。

2. HPLC 層析圖之滯留時間：coptisine 為 42.02 分；berberine 為 70.01 分；sennoside A 為 67.72 分；baicalin 為 86.99 分；harpagoside 為 89.97 分；baicalein 為 103.12 分；emodin 為 114.16 分 (圖 81~82)。

3. 定量結果：

(1) 油性：coptisine 之含量為 $232.64 \pm 37.65 \mu\text{g/mL}$ ；berberine 之含量為 $15.39 \pm 81.21 \mu\text{g/mL}$ ；sennoside A 之含量為 $272.39 \pm 137.17 \mu\text{g/mL}$ ；baicalin 之含量為 $340.78 \pm 63.70 \mu\text{g/mL}$ ；

baicalein 之含量為 $187.31\mu\text{g/mL}$ ；emodin 之含量為 $163.07 \pm 45.19\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 水性：coptisine 之含量為 $296.00 \pm 38.85\mu\text{g/mL}$ ；berberine 之含量為 $8.63 \pm 59.12\mu\text{g/mL}$ ；sennoside A 之含量為 $320.90 \pm 67.77\mu\text{g/mL}$ ；baicalin 之含量為 $58.78 \pm 64.53\mu\text{g/mL}$ ；baicalein 之含量為 $234.24 \pm 87.61\mu\text{g/mL}$ ；emodin 之含量為 $34.01 \pm 145.99\mu\text{g/mL}$ 。

6. 萬應膏藥膠布已知皮膚穿透成分的動物藥效評估

6.1 Ferulic acid 及 Cinnamic acid 止痛藥效動物試驗

止痛藥效動物試驗以小白鼠 Writhing 試驗模式分析動物腹腔注射給予 Ferulic acid 及 Cinnamic acid 後抑制醋酸溶液刺激所引起之疼痛扭曲次數來評估其止痛效果。結果顯示（圖 83）兩者在 10 mg/kg 劑量下無顯著抑制醋酸溶液刺激所引起之疼痛扭曲次數，然在 25 mg/kg 劑量下則發現有顯著抑制醋酸溶液刺激所引起之疼痛扭曲次數（ $p < 0.01$ ），之故 Ferulic acid 及 Cinnamic acid 均具有止痛藥效，另 Cinnamic acid 之止痛效果較 Ferulic acid 好（ $p < 0.05$ ）。

6.2 抗腫脹藥效動物試驗

抗腫脹藥效動物試驗則以腫脹測定儀測定動物經腹腔注射給予 Ferulic acid 及 Cinnamic acid 後舒緩 Carrageenan 引起足蹠腫脹之效能。結果（圖 84）發現 Cinnamic acid 在 10 mg/kg 及 25 mg/kg 劑量下均無顯著的抗腫脹藥效。而 Ferulic acid 在 10 mg/kg 劑量下均無顯著的抗腫脹藥效，但劑量提昇至 Ferulic acid（ 25 mg/kg ）時則發現有顯著的抗腫脹藥效（ $p < 0.05$ ）。之故 Ferulic acid 有舒緩 Carrageenan 引起足蹠腫脹之功效。

6.3 消炎藥效試驗

消炎藥效是測定動物經腹腔注射給予 Ferulic acid 及 Cinnamic acid 後抑制組織胺引起 Pontamine sky blue 染劑滲出之能力，結果（圖 85）顯示兩者在 10 & 25 mg/kg 劑量下均無發現顯著抑制組織胺引起染劑滲出之能力（ $p > 0.05$ ）。

7. 以替代方法評估中藥藥膠布之皮膚過敏性研究

測試結果報告

7.1 萬應膏及綠云膏成品皮膚刺激性試驗

萬應膏（油性）及綠云膏（油性及水性）成品在紐西蘭白兔皮膚所

測試結果依「皮膚刺激性計分系統」觀察所得計分如下表：

藥膠布成品	皮膚刺激性計分系統得分																		皮膚指數	刺激程度
	觀察天數																			
	1						2						3							
萬應膏（油性）	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	2.78	中度
空白膠布（油性）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無
綠云膏（油性）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無
空白膠布（油性）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無
綠云膏（水性）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無
空白膠布（水性）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無

*皮膚刺激指數（PDII）= 總得分/觀察次數

觀察次數 = 觀察天數 x 動物數

7.2 萬應膏及綠云膏處方個別藥材皮膚刺激性試驗

7.2.1 萬應膏處方個別藥材之浸膏經以 Finn Chamber Patch Test 測試結果如下：

註：陽性對照品為 1% 2,4-dinitrochlorobenzene

藥材名稱	皮膚刺激性計分系統得分									皮激 膚指 刺數	刺程 激度 性
	觀察天數										
	1			2			3				
陽性對照	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1.33	弱
白芷	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0.33	幾乎無
羌活	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4.00	中度
苦蔘	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	無
白芨	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0.56	弱
木鱉子	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4.00	中度
元蔘	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0.56	弱
生地黃	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0.56	弱
白薇	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0.22	幾乎無
甘草	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0.22	幾乎無
烏藥	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0.33	幾乎無
赤芍	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0.33	幾乎無
肉桂	1	2	2	1	0	0	1	0	0	0.78	弱
草烏	2	2	2	1	0	0	1	0	0	0.89	弱
川烏	2	2	1	1	0	0	1	0	0	1.00	弱
當歸	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0.78	弱
獨活	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0.44	幾乎無
大黃	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0.33	幾乎無
萬應膏	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2.78	中度
陰性對照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	無

陰性對照品為水萬應膏為未塗布前之半成品

7.2.2 萬應膏處方個別藥材之浸膏 10 倍稀釋液經以 Finn Chamber Patch Test 測試結果如下：

藥材名稱	皮膚刺激性計分系統得分									皮激 膚指 刺數	刺程 激度 性
	觀察天數										
	1			2			3				
陽性對照	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1.33	弱
白芷	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0.22	幾乎無
羌活	3	2	3	3	2	2	3	2	2	2.40	中度
苦參	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	無
白芨	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0.44	幾乎無
木鱉子	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0.33	幾乎無
元參	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0.22	幾乎無
生地黃	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0.44	幾乎無
白蘞	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.11	幾乎無
甘草	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0.22	幾乎無
烏藥	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.11	幾乎無
赤芍	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0.33	幾乎無
肉桂	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0.88	弱
草烏	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.11	幾乎無
川烏	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	無
當歸	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.11	幾乎無
獨活	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0.44	幾乎無
大黃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	無
陰性對照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	無

註：陽性對照品為 1% 2,4-dinitrochlorobenzene

陰性對照品為水

萬應膏為未塗布前之半成品

7.2.3 綠云膏處方個別藥材之浸膏經以 Finn Chamber Patch Test 測試結果如下：

藥材名稱	皮膚刺激性計分系統得分									皮激 膚指 刺數	刺程 激度 性
	觀察天數										
	1			2			3				
黃芩	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無
黃連	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0.44	幾乎無
元蓼	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	無
黃柏	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0.33	幾乎無

註：與萬應膏同成分之藥材不再重複

因受試之藥材刺激性低，因此不再進行 10 倍稀釋液之測試

7.3 人體表皮組織套組 EpiDerm™ (EPI-200 kit) 皮膚刺激性試驗結果：

4 小時 550 nm

編號	PC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
吸光度	0.575	2.155	2.057	1.756	2.163	2.352	1.991	2.012	2.199	2.082	2.453	2.038
	0.609	2.073	2.391	1.668	2.218	2.366	2.086	2.158	2.372	2.785	2.449	2.175
	0.616	1.979	2.486	1.553	2.302	2.300	2.118	2.173	2.400	2.661	2.890	2.202
平均值	0.600	2.069	2.311	1.659	2.228	2.339	2.065	2.114	2.324	2.509	2.587	2.138
存活率 %	25.81	88.99	99.40	74.80	95.83	100.60	88.82	90.92	99.96	107.91	111.27	91.96
編號	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC
吸光度	2.199	2.127	2.202	2.513	2.137	2.417	2.864	2.404	1.792	2.189	1.628	1.936
	2.210	2.226	2.184	2.694	2.885	2.463	2.944	2.567	1.763	2.213	2.304	2.537
	2.379	2.229	2.332	2.740	2.931	2.577	3.006	2.646	1.307	2.227	2.342	2.502
平均值	2.263	2.194	2.239	2.649	2.651	2.486	2.938	2.539	1.621	2.210	2.091	2.325
存活率 %	97.33	94.37	96.30	113.93	114.02	106.92	126.37	109.20	69.72	95.05	89.93	100

8 小時 550 nm

編號	+C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
吸光度	0.167	1.618	1.625	0.678	2.300	2.013	1.876	1.608	2.178	2.248	1.940	1.962
	0.157	1.566	1.989	0.646	1.516	2.104	2.033	1.780	2.210	2.509	2.328	2.018
	0.178	1.634	1.920	0.734	2.512	1.843	2.092	1.880	2.239	2.557	2.424	2.037
平均值	0.167	1.606	1.845	0.686	2.109	1.987	2.000	1.756	2.209	2.438	2.231	2.006
存活率 %	7.53	72.41	83.18	29.51	95.09	89.60	90.17	79.17	99.59	109.92	100.59	90.44
編號	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC
吸光度	2.172	1.894	2.066	2.312	2.515	2.415	2.374	2.161	1.324	2.233	1.992	-
	1.888	2.019	2.053	2.313	2.551	2.598	1.808	2.432	1.392	2.322	1.831	-
	2.368	1.996	2.110	2.463	2.572	2.600	1.458	2.480	1.474	1.802	2.086	2.218
平均值	2.142	1.970	2.076	2.363	2.546	2.538	1.88	2.358	1.397	2.119	1.970	2.218
存活率 %	96.57	88.82	93.60	106.54	114.79	114.43	84.76	106.31	62.98	95.54	88.82	100

20 小時 550 nm

編號	PC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
吸光度	0.093	1.082	0.559	0.323	0.347	0.295	0.607	1.704	1.699	1.071	0.871	1.257
	0.094	1.372	0.957	0.414	0.402	0.309	0.608	1.737	1.680	1.016	0.939	1.284
	0.090	1.431	0.998	0.597	0.396	0.295	0.653	1.666	1.571	1.294	0.970	1.304
平均值	0.092	1.295	0.838	0.445	0.382	0.300	0.623	1.702	1.650	1.172	0.927	1.282
存活率 %	4.17	58.65	37.95	20.15	17.30	13.59	28.22	77.08	74.73	53.08	41.98	58.06
編號	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC
吸光度	0.591	0.958	0.468	0.969	0.879	1.161	0.997	1.953	1.269	0.542	1.036	2.158
	0.597	1.067	0.471	1.004	0.964	1.345	1.007	2.021	1.225	0.531	1.067	2.232
	0.590	1.106	0.474	0.996	0.962	1.342	1.006	2.081	1.126	0.517	1.071	2.235
平均值	0.593	1.044	0.471	0.990	0.935	1.283	1.003	2.018	1.207	0.530	1.058	2.208
存活率 %	26.86	47.28	21.33	44.84	42.34	58.11	45.43	91.39	54.66	24.00	47.92	100

存活率% = (樣品吸光度/陰性對照吸光度) x 100

編號		PC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
存活率 %	4 hr	25.81	88.99	99.40	74.80	95.83	100.60	88.82	90.92	99.96	107.91	111.27	91.96
	8 hr	7.53	72.41	83.18	29.51	95.09	89.60	90.17	79.17	99.59	109.92	100.59	90.44
	20 hr	4.17	58.65	37.95	20.15	17.30	13.59	28.22	77.08	74.73	53.08	41.98	58.06
ET50 (hr)		<4	>20	16.8	6.2	15	14.2	15.8	>20	>20	>20	18.4	>20
刺激性		2	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4
編號		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC
存活率 %	4 hr	97.33	94.37	96.30	113.93	114.02	106.92	126.37	109.20	69.72	95.05	89.93	100
	8 hr	96.57	88.82	93.60	106.54	114.79	114.43	84.76	106.31	62.98	95.54	88.82	100
	20 hr	26.86	47.28	21.33	44.84	42.34	58.11	45.43	91.39	54.66	24.00	47.92	100
ET50 (hr)		16	19.2	15.2	18.8	18	>20	17.4	>20	>20	14.8	18.2	0
刺激性		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	無

註：代號

PC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1%TX	萬應膏	白芷	羌活	白及	木鱉	元參	生地	黏膠	甘草	烏藥	赤芍
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NC
肉桂	草烏	川烏	當歸	獨活	大黃	萬應膏	黃芩	黃連	黃柏	綠云膏	水

刺激性：1 強/嚴重 (ET50 < 0.5) 2 中度 (ET50 0.5-4)

3 中度至弱 (ET50 4-12) 4 非常弱 (ET50 12-24)

7.4 萬應膏及綠云膏成品皮膚過敏性試驗

7.4.1 誘導期間之皮膚反應

藥膠布成品	皮膚刺激性計分系統得分															
	誘導過敏期 (星期)*															
	1				2				3							
萬應膏 (油性)	3	3	3	3	3	3	-**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
空白膠布 (油性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
綠云膏 (油性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空白膠布 (油性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
綠云膏 (水性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空白膠布 (水性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*每星期一次，每次 6 小時

**萬應膏貼布在第一次誘導即呈現顯著紅斑，因此未再進行第二星期誘導

7.4.2 激發期後皮膚反應

藥膠布成品	皮膚刺激性計分系統得分															
	激發後觀察天數															
	1				2				3							
綠云膏 (油性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空白膠布 (油性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
綠云膏 (水性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空白膠布 (水性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

8.十全大補藥酒增強外因性免疫功能低下小鼠之免疫功能與造血機能之研究

小鼠餵食 10 μ l/day 或 50 μ l/day 十全大補藥酒，或以等量之調味酒精或是不餵食之小鼠作為控制組。餵食一個月後，小鼠以腹腔注射方式給予兩劑抗癌藥物 cyclophosphamide，其中 A 組之劑量為 2 mg/kg 小鼠體重與 4 mg/kg 小鼠

體重，於第零天(以餵食藥酒算起之第三十一天) 注射第一劑，並於第四天注射第二劑；B 組則分別給予 8 mg/kg 與 16 mg/kg 兩劑，注射時間與 A 組相同。小鼠於第十天犧牲。圖 86 顯示小鼠經注射低劑量 cyclophosphamide 後之脾臟重量恢復的情形。實驗結果得知餵食 10 μ l/day 藥酒之脾臟恢復較其他組顯著，然而對於餵食 50 μ l/day 藥酒的組別則沒有增加，反而有輕微減少的趨勢。在給予增加為兩倍劑量之 cyclophosphamide 以加強免疫抑制的作用下，餵食 10 μ l/day 藥酒小鼠之脾臟重量增加的程度更為顯著，一般正常未給予任何藥物處理之小鼠脾臟重約 80-110 mg，由圖 87 得知，餵食 10 μ l/day 藥酒組別之小鼠脾臟可增加至一般正常之兩倍重，而與圖 86 所示結果類似，餵食 50 μ l/day 藥酒組別的小鼠脾臟重量並未增加，甚至有輕微減少。

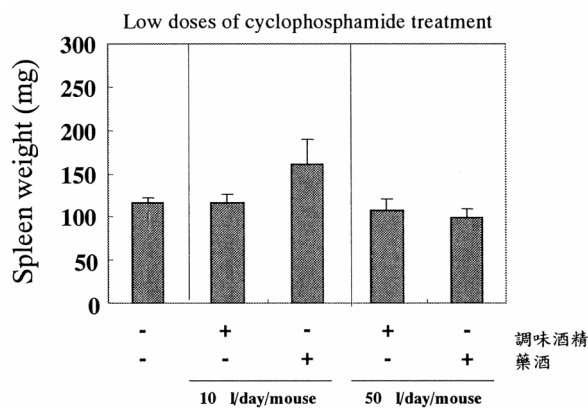


圖 86

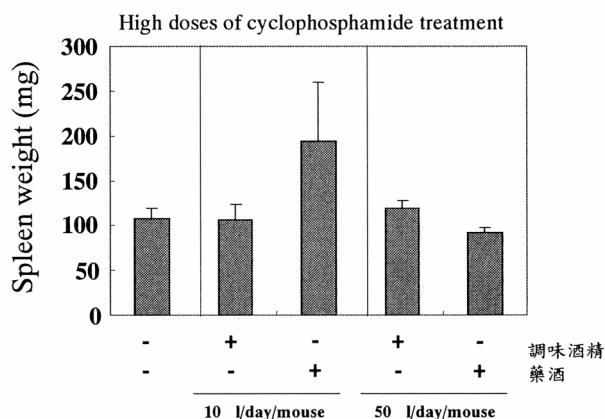


圖 87

將脾臟研磨後製成細胞懸浮液後，計算脾臟細胞數目。圖 88 顯示低劑量 cyclophosphamide 處理後第六天，小鼠脾臟細胞數目恢復的情形。餵食 10 μ l/day 藥酒組別之小鼠脾臟細胞數目有些許增加，另一方面，餵食 50 μ l/day 藥酒組別之小鼠脾臟細胞數目則反而減少。於高劑量 cyclophosphamide 處理之下，餵

食 10 μ l/day 藥酒組別之小鼠脾臟細胞數目較其他組有顯著增加 (圖 89)，而餵食 50 μ l/day 藥酒組別之小鼠脾臟細胞數目則減少。

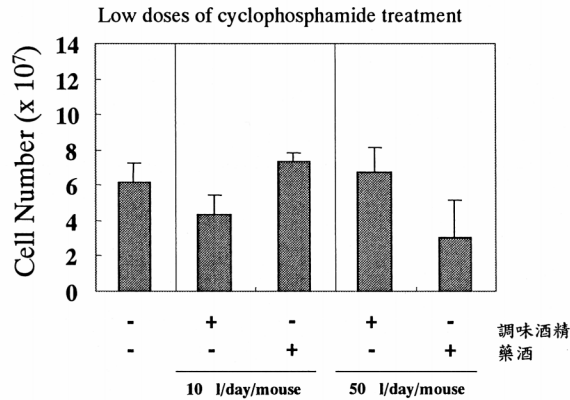


圖 88

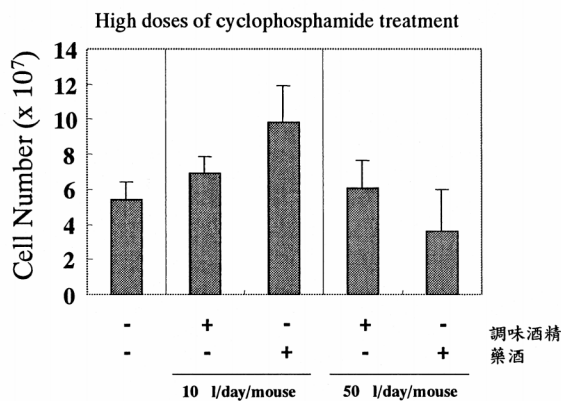


圖 89

上一年度計畫中的結果顯示在正常免疫功能小鼠餵食十全大補藥酒後所增生的脾臟細胞中，巨噬細胞的比例有增加的趨勢，為進一步了解十全大補酒是否再免疫抑制小鼠模式中具有相同之效果，我們同樣以流式細胞分析巨噬細胞在脾臟細胞中所佔的比例。如圖 90 顯示，餵食 10 μ l/day 藥酒組別之小鼠脾臟細胞的巨噬細胞數目增加，然而，餵食 50 μ l/day 藥酒組別之小鼠巨噬細胞數目未明顯改變。於高劑量 cyclophosphamide 處理之下，餵食 10 μ l/day 藥酒組別之小鼠巨噬細胞數目較其他組有顯著增加 (圖 91)，顯示適量十全大補藥酒增加巨噬細胞的增生與分化。為了解巨噬細胞增生我們偵測血清中影響巨噬細胞增生分化相關細胞激素與生長因子。

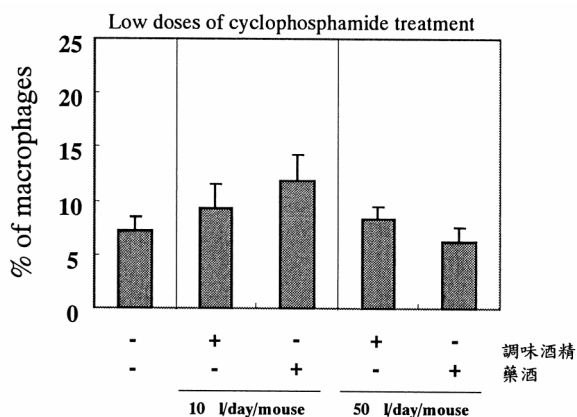


圖 90

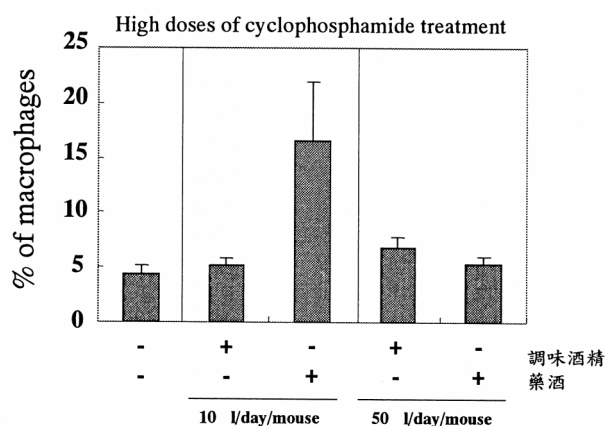


圖 91

我們以 ELISA 試劑組分析血清中 GM-CSF、IL-3、M-CSF 與 SCF 的含量。我們無法偵測到各組小鼠血清中含有 GM-CSF、IL-3 與 SCF (data not shown)，而 M-CSF 在血清中的含量則在 200-250 pg/ml 的濃度。然而我們的結果顯示各組血清中 M-CSF 濃度無顯著差異(圖 92 與圖 93)。

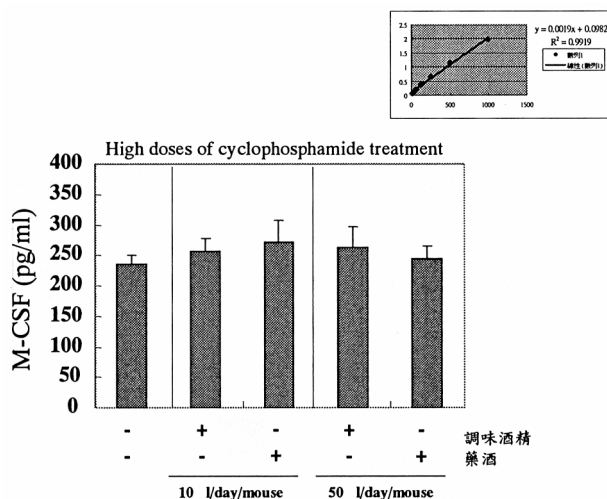


圖 92

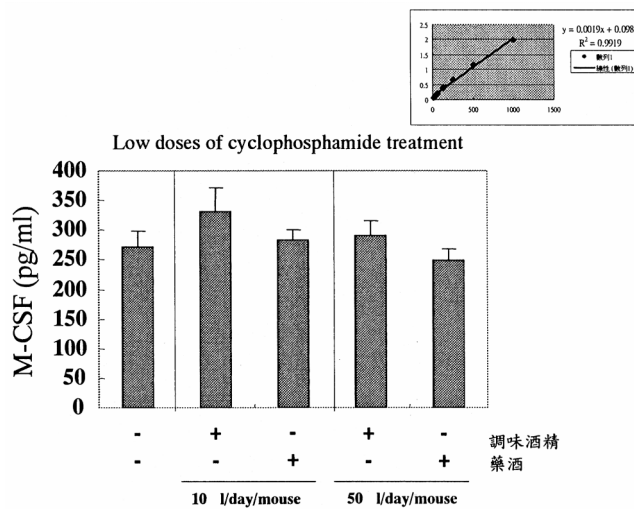


圖 93

為加強證實藥酒對重度免疫功能抑制小鼠免疫的增強作用，以及了解免疫系統恢復的時間，我們於 C 組將 cyclophosphamide 的劑量增加為次致死劑量 200 mg/kg，並在連續餵食第三、五、十與第二十天後，測量小鼠體重、抽血後犧牲小鼠及測量其他免疫系統參數。圖 94 顯示小鼠在注射抗癌藥 cyclophosphamide 後，藥酒餵食之有與無和小鼠體重之關係。單一劑量 cyclophosphamide 與餵食藥酒與否對於小鼠體重無顯著改變。然而在小鼠脾臟重量方面，我們可以發現注射 cyclophosphamide 造成小鼠脾臟迅速萎縮，於第三與第五天達到最低（圖 95）。由於我們注射之 cyclophosphamide 劑量為略低於致死劑量，注射後小鼠體內免疫系統並未完全破壞，所以小鼠自體免疫系統於第五天後開始有代償的現象發生，脾臟開始腫脹，注射 cyclophosphamide 後第十天脾臟重量甚至超過沒有注射之小鼠脾臟。而在第二十天時，脾臟重量則逐漸下降。在注射後第三與第五天，無論餵食藥酒或是調味酒精，脾臟重量在各組無顯著差異，顯示藥酒並無法抑制 cyclophosphamide 對免疫系統的抑制作用，然而在注射藥物第十天，餵食十全大補藥酒的小鼠脾臟重量較餵食調味酒精為重，且以一倍劑量（10 μ l/mouse）之藥酒所產生的效果較餵食三倍劑量者（30 μ l/mouse）之效果高（圖 95），而在第二十天，脾臟重量無論在任何一組，均呈現減少。我們計算脾臟內細胞數目發現，小鼠未給予任何藥物或藥酒處理下，平均每一脾臟內含約 4-5 $\times 10^7$ 個細胞，而注射 cyclophosphamide 後第三天，細胞數目顯著下降，剩餘不到十分之一，無論是否餵食十全大補藥酒與否（圖 96）。於第五天，無藥酒之組別的小鼠脾臟細胞數目開始上升，但是

有餵食藥酒的小鼠脾臟細胞則尚未增加。到第十天，餵食一倍藥酒(10 μ l/mouse)之小鼠脾臟細胞數目較僅餵食同體積調味酒精的細胞增加近兩倍。在餵食三倍酒精量之小鼠脾臟細胞數目也較餵食一倍酒精量的小鼠脾臟細胞數目增加，餵食三倍十全大補藥酒的小鼠脾臟細胞數目雖然也增加，但是與餵食三倍酒精量之組別比較並不明顯，相較於餵食一倍藥酒之小鼠脾臟細胞數目，30 μ l/mouse 十全大補藥酒並沒有更增加脾臟細胞數目。有趣的是，到了第二十天，僅餵食調味藥酒的組別，無論一倍或三倍酒精量，脾臟細胞數目較第十天所測得之數目下降，但對於餵食藥酒的組別則下降程度不顯著(圖 96)。

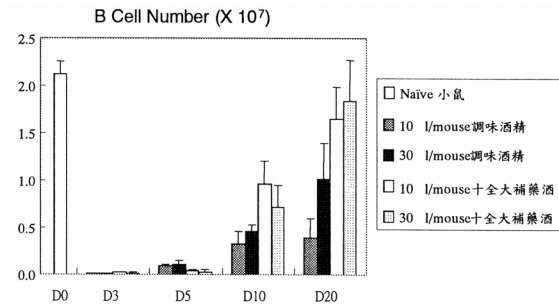


圖 97

我們進一步觀察脾臟內各類免疫細胞的總量變化，期望了解脾臟細胞數目增減是否導因於特定族群細胞之數目改變。圖 97 顯示脾臟中 T 淋巴細胞的時間變化，餵食酒精之控制組小鼠脾臟 T 細胞的數目於第三天降至最低，但是在第五天已開始上升，於第二十天時下降。餵食藥酒組別小鼠的脾臟 T 淋巴細胞數目雖在第五天尚未明顯回升，但在第十天之回升數目已略高過控制組，而在第二十天的時候，有餵食藥酒的 T 淋巴細胞數目依然維持在較高的數量，其數目為控制組的兩倍。我們進一步了解 T 細胞中輔助型 T 細胞 ($CD4^+$ T helper; T_H) 與細胞毒殺型 T 細胞 ($CD8^+$ T cytotoxic; T_C) 實際數目，圖 98 與圖 99 顯示無論是輔助型 T 細胞 ($CD4^+$) 或細胞毒殺型 T 細胞 ($CD8^+$)，各組細胞數目之變化曲線與總 T 淋巴細胞數目變化 (圖 97) 相似，顯示在 T 淋巴細胞數目增加與否並非針對特定次族群 T 細胞造成改變，我們也將各組小鼠脾臟內輔助型 T 細胞與細胞毒殺型 T 細胞相對比例相互對照，發現並無顯著改變 (圖 100)。我們推測藥酒的效用可能不是特定增強細胞性 (cellular) 或是體液性 (humoral) 免疫功能，而是一廣泛性增加細胞數目。

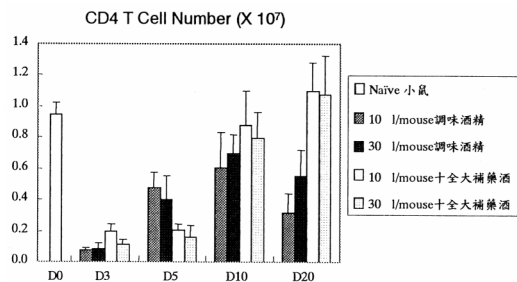


圖 98

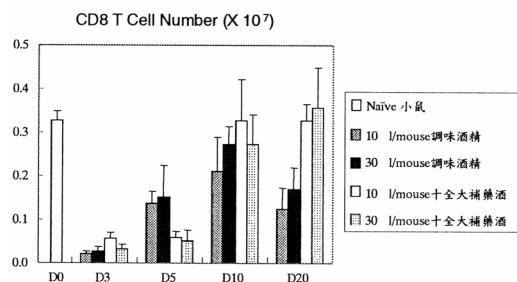


圖 99

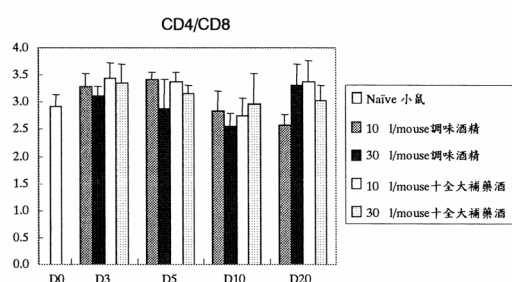


圖 100

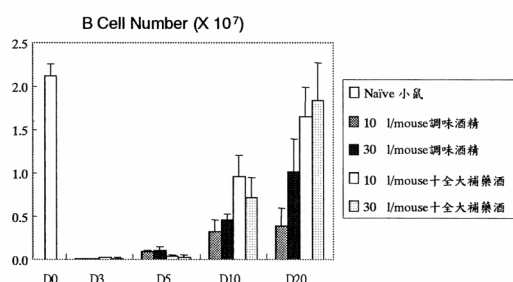


圖 101

除了 T 細胞，我們也觀察 B 淋巴細胞的數目變化。直至所偵測的最長時間(二十天)，B 淋巴細胞表現出與 T 細胞不同的增生曲線，無論是哪一組，B 細胞的數量自注射 cyclophosphamide 後第三天起皆隨時間增加而增加，其中餵食 30 μ l/mouse 酒精的組別所增加 B 細胞數目較 10 μ l/mouse 酒精餵食控制組高，然而以第二十天為例，一倍劑量(10 μ l/mouse) 藥酒餵食所增加的 B 細胞數目為餵食同體積酒精的三倍，而三倍藥酒劑量餵食組約為等量酒精之兩倍(圖 101)。餵食十全藥酒的組別，無論是 10 μ l/mouse 或 30 μ l/mouse，均顯著較控制組增加。另一在脾臟中佔一定比例的巨噬細胞(macrophage)也是我們觀測的目標。圖 102 顯示餵食酒精之控制組在第五天起，巨噬細胞數目有逐漸增加，在第十天超過與未給藥物處理小鼠脾臟中巨噬細胞的平均數目，在第二十天時則降至正常小鼠之巨噬細胞的平均數。而餵食十全大補藥酒的兩組小鼠，其脾臟中巨噬細胞增加較控制組約為兩倍的數目，但是和酒精餵食之控制組相似的是均在第二十天後下降。

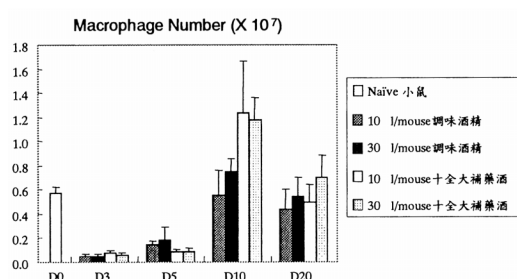


圖 102

我們針對幾個細胞生長激素以 ELISA 方法分析血清中的濃度。圖 103 至圖 105 顯示我們並未發現生長激素與細胞激素在各組之間有任何差異。

肆、討論

1. 本補遺計劃為延續執行 90 及 91 年計畫，已開發萬應膏、綠云膏二處中藥藥膠布及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒二處方藥酒，為能符合衛生署中藥新藥申請臨床試驗所須檢附之化學製造品質管制（CMC）資料，再行補充，建立一套完整性之藥膠布及藥酒之檢驗及臨床之標準操作程序（SOP），以便能提供給產業界在中藥藥膠布及藥酒二劑型在製程及品管之依循方法及參考依據。

本研究已完成萬應膏、綠云膏二藥膠布處方及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒二藥酒處方之製造管制標準作業程序，各項化學製造品質管制檢驗之標準作業程序及動物臨床實驗之標準作業程序，提供將來產業界在藥膠布及藥酒製劑之製程及品管之依循方法及參考依據。

2. 本整合型計劃所開發之萬應膏、綠云膏二藥膠布處方及金門龍鳳藥酒、十全大補藥酒二藥酒皆屬新藥。因此，為能符合衛生署中藥新藥申請臨床試驗所須檢附之化學製造品質管制（CMC）資料內，所需檢附檢驗成績書三份，故由國內三家 GMP 藥廠購得所需藥材，進行製造及各項之檢驗，由檢驗結果顯示，具有差異性。若要制定藥膠布及藥酒之各項 CMC 資料規格，應再收集更多之此四處方之藥膠布及藥酒製劑之資料，以符合藥材之實際內容。

伍、結論與建議

1. 藥膠布為國人常用外用製劑，但市場上之藥膠布品質參差不齊，療效也無法確立。本整合三年型計劃，由前兩年之針對藥膠布處方內藥材指標成分檢驗方法之開發，及動物臨床實驗療效確立。至今年的將萬應膏及綠云膏藥膠布製程標準程序化，及增加此二藥膠布之化學製造品質管制各項資料。感謝此三年中醫藥委員會之支持及大家之努力，藥膠布製劑之製程及品管的制定是可行的。更希望本研究的結果可提供在產業界作為藥膠布製劑一套完整可依循之品管依據。
2. 藥酒也是國人喜愛飲用之酒類之一，但國產之酒精濃度皆太高，而無法達普遍性。同時，市場上之藥酒也常常無法檢出藥材之指標成分，而無法確立藥酒之品質。本群體計劃也開發 14% 之低酒精濃度金門龍鳳藥酒及十全大補二藥酒，針對藥酒之製程規格化及品質管制之制定，也完成一套可依循之品管依據。以提供給產業界作為完整之藥酒製劑品管參考。

陸、參考文獻

- 1.丘永福，林磐聳，高思聖，食品衛生檢驗手冊，行政院衛生署員工消費合作社，1985。
- 2.江華洲，荔枝浸漬酒成分與色澤變化之探討，國立台灣大學食品科技研究所碩士論文，p51~55，2001。
- 3.原田正敏。1989。繁用生藥之成分定量，廣川書店。
- 4.高效液相層析儀(HPLC)、氣相層析儀(GC)之應用與實習講義。1995。財團法人製藥工業技術發展中心。
- 5.Ochi T, Motoyama Y, Goto T. Analgesic Effect Profile of FR122047, a Selective Cyclooxygenase-1 Inhibitor, in Chemical Nociceptive Models. Eur. J. Pharmacol. 2000; 391: 49-54.
- 6.Hargreaves KM, Dubner R, Costello AH. Corticotropine Releasing Factor(CRF) Has a Peripheral Site of Action for Antinociception. Enrop. J. Pharmacol. 1989; 170: 275-279.
- 7.Burch RM, DeHaas CA. Bradykinin Antagonist Inhibits Carrageenan Edema in Rats. N-S Arch Pharmacol. 1990; 342: 189-193.

表二、金門龍鳳藥酒成品於澄清度改善前後吸光值及色度、色調之比較

	90 年 龍鳳酒	A 藥廠 龍鳳酒	B 藥廠 龍鳳酒	C 藥廠 龍鳳酒
A ₄₂₀	1.86± 0.00	0.73± 0.00	0.50± 0.00	0.65± 0.00
A ₅₂₀	1.01± 0.00	0.13± 0.00	0.00± 0.00	0.03± 0.00
I 值	2.88± 0.00	0.86± 0.00	0.50± 0.00	0.68± 0.00
H 值	1.84± 0.01	5.44± 0.13	91.17± 11.08	22.26± 1.16

表三、十全大補藥酒成品於澄清度改善前後吸光值及色度、色調之比較

	91 年 十全酒	A 藥廠 十全酒	B 藥廠 十全酒	C 藥廠 十全酒
A ₄₂₀	2.38± 0.00	2.00± 0.00	1.70± 0.00	1.14± 0.00
A ₅₂₀	1.30± 0.00	0.27± 0.00	0.30± 0.00	0.10± 0.00
I 值	3.68± 0.00	2.27± 0.00	2.01± 0.00	1.25± 0.00
H 值	1.83± 0.00	7.51± 0.05	5.63± 0.07	11.05± 0.22

表四、金門龍鳳藥酒成品於澄清度改善前後 L.a.b 值之比較

	90 年 龍鳳酒	A 藥廠 龍鳳酒	B 藥廠 龍鳳酒	C 藥廠 龍鳳酒
L 值	38.92± 0.16	75.19± 0.02	86.61± 0.02	84.04± 0.00
a 值	5.97± 0.04	1.29± 0.03	-0.02± 0.02	-0.62± 0.01
b 值	20.93± 0.07	24.45± 0.01	25.06± 0.01	27.70± 0.02

表五、十全大補藥酒成品於澄清度改善前後 L.a.b 值之比較

	91 年 十全酒	A 藥廠 十全酒	B 藥廠 十全酒	C 藥廠 十全酒
L 值	25.10±0.06	71.18±0.00	66.99±0.00	79.59±0.01
a 值	-0.26±0.02	4.59±0.00	4.73±0.02	4.85±0.01
b 值	12.75±0.03	39.81±0.01	35.57±0.01	34.20±0.00

表六、龍鳳酒及十全大補酒之官能品評

	香氣	色澤	口感	整體接受性
90 年 龍鳳酒	3.64 ±1.39	4.07±0.83	2.93±0.73	2.86±0.53
91 年 十全大補酒	2.36±0.93	2.36±0.84	2.21±0.80	2.00±0.55
92 年 龍鳳酒	3.57±0.65	3.64±0.63	3.14±0.36	3.71±0.61
92 年 十全大補酒	4.07±0.83	4.00±0.39	3.86±1.10	4.14±0.77

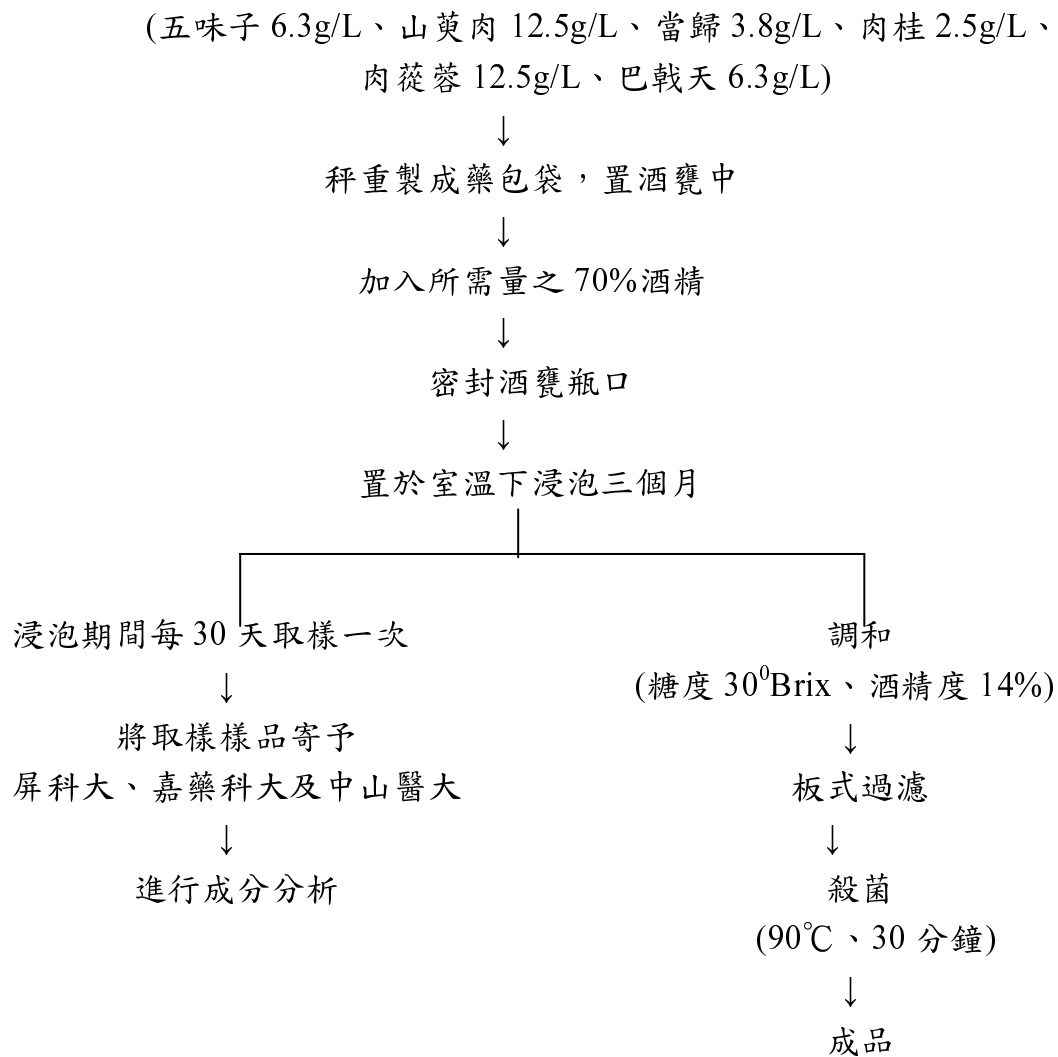


圖 1. 龍鳳酒試製之流程圖

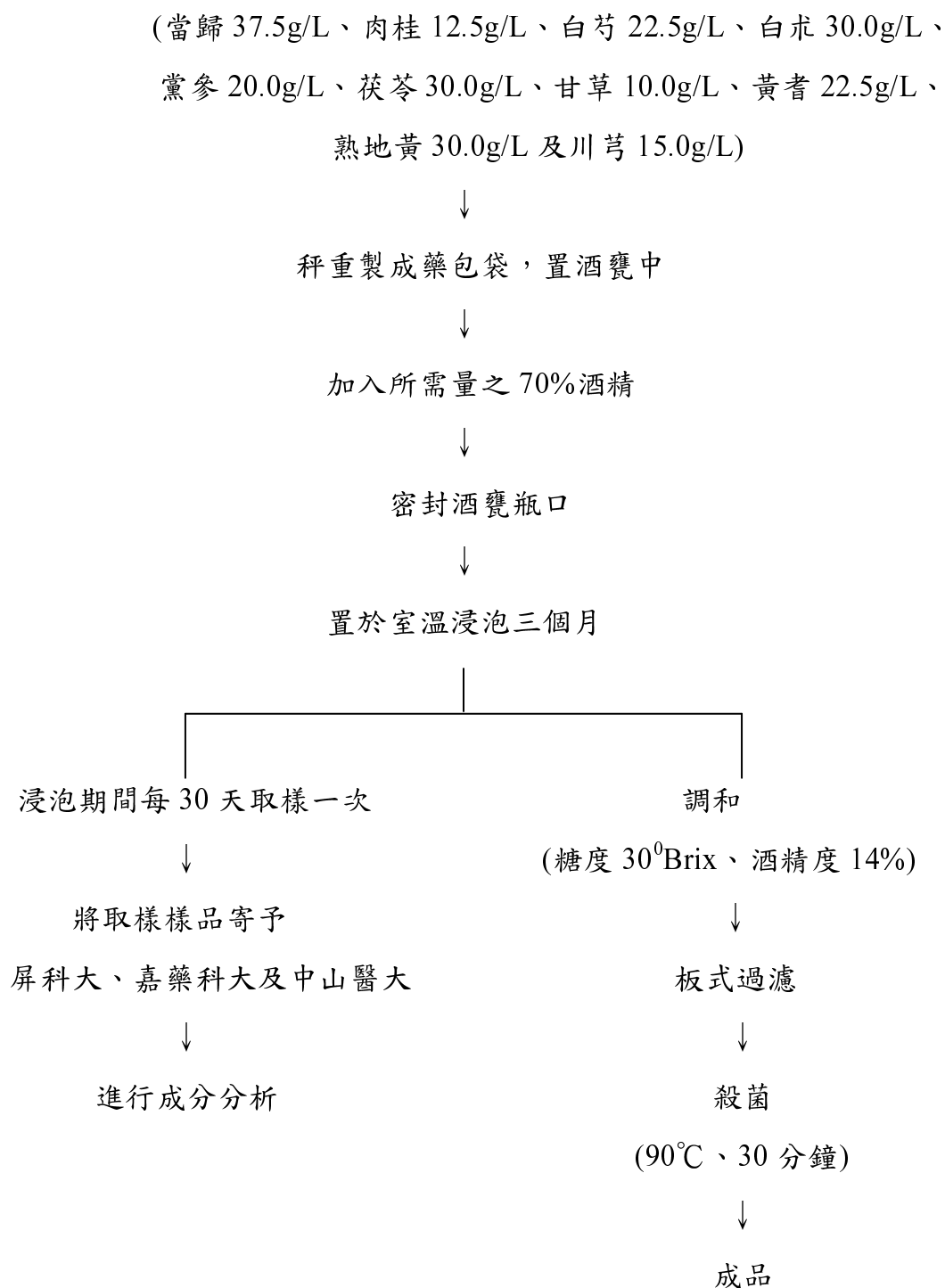


圖 2.十全大補藥酒試製之流程圖

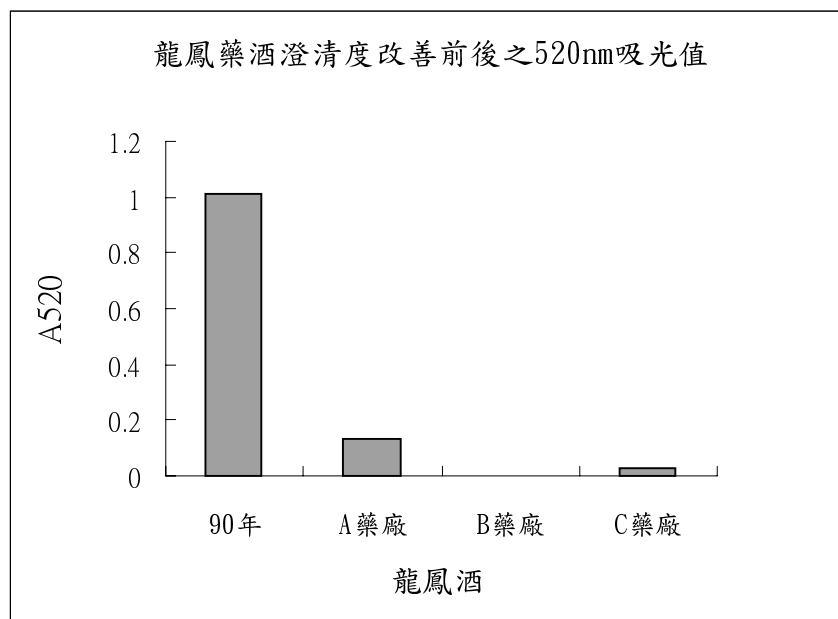
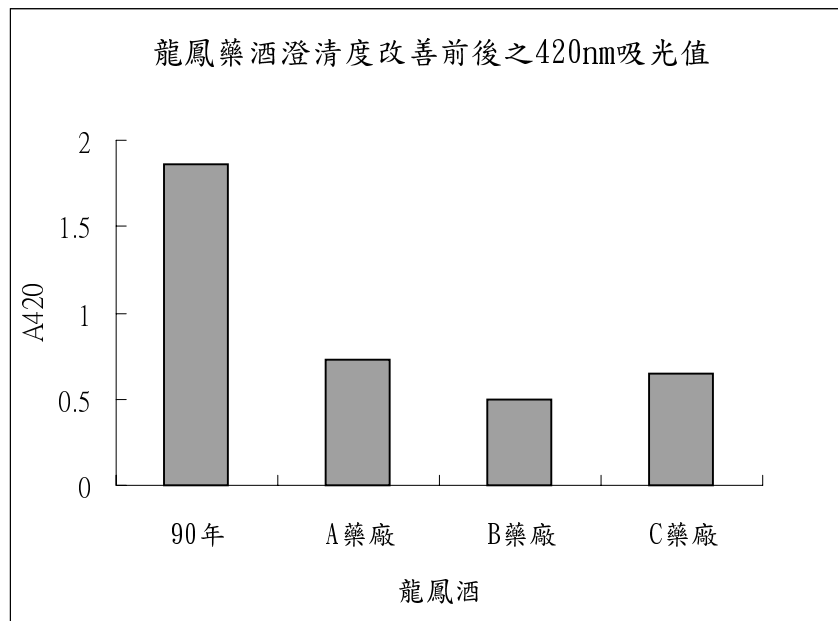


圖 3. 金門龍鳳藥酒之澄清度於改善前後吸光值之比較

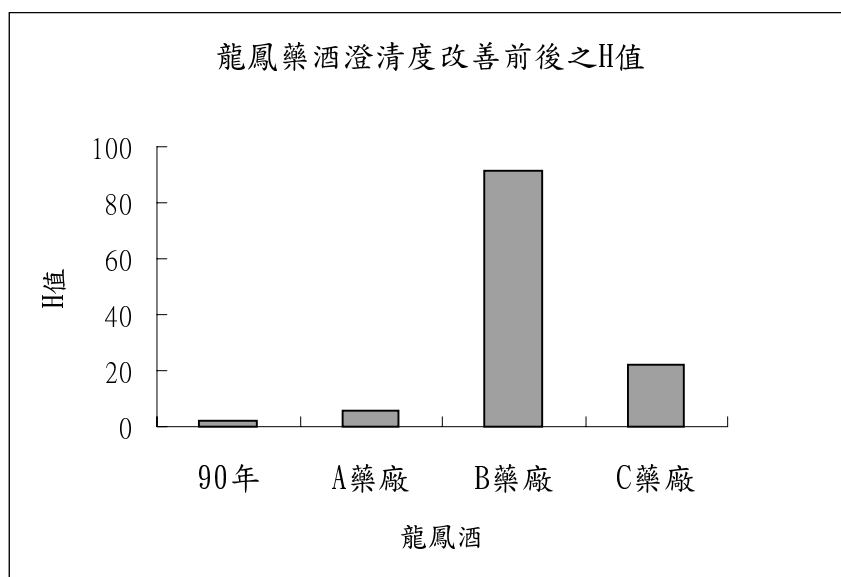
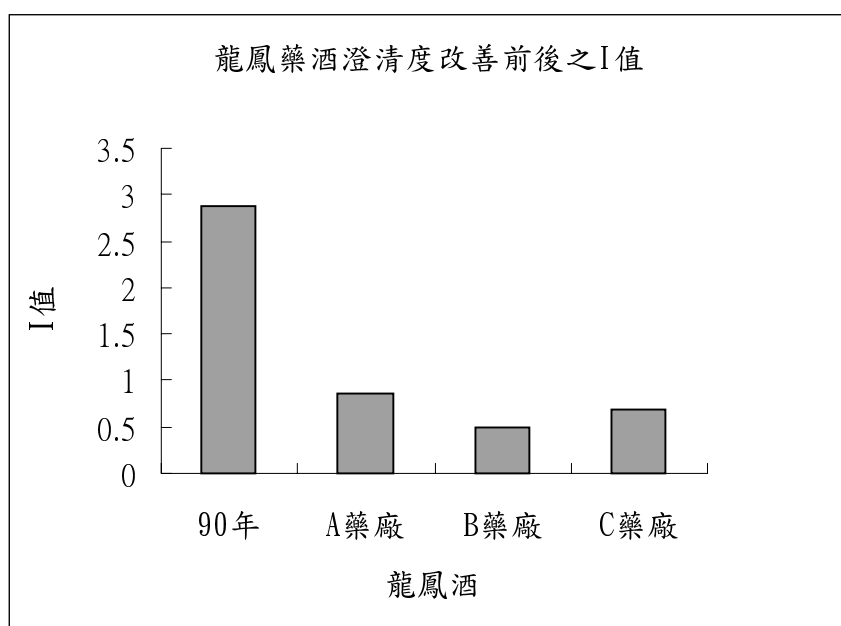


圖 4. 金門龍鳳藥酒之澄清度於改善前後色度及色調之比較

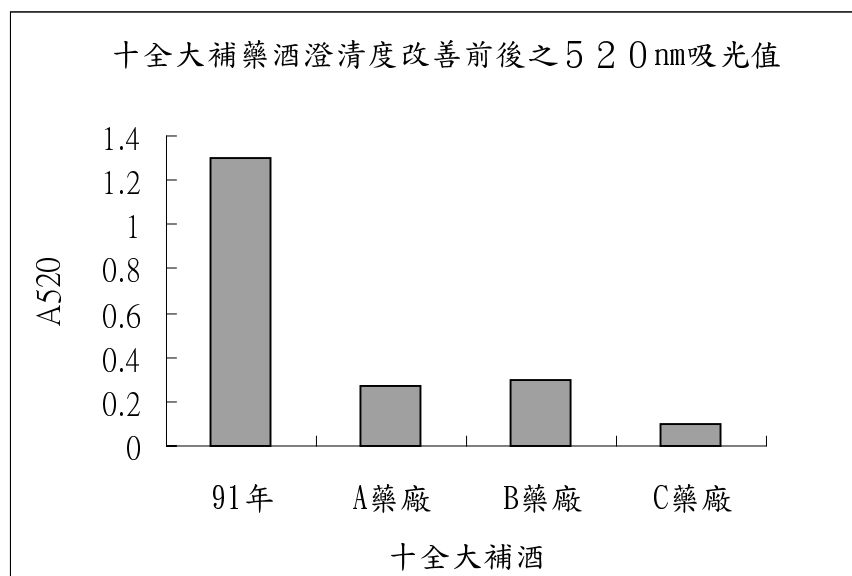
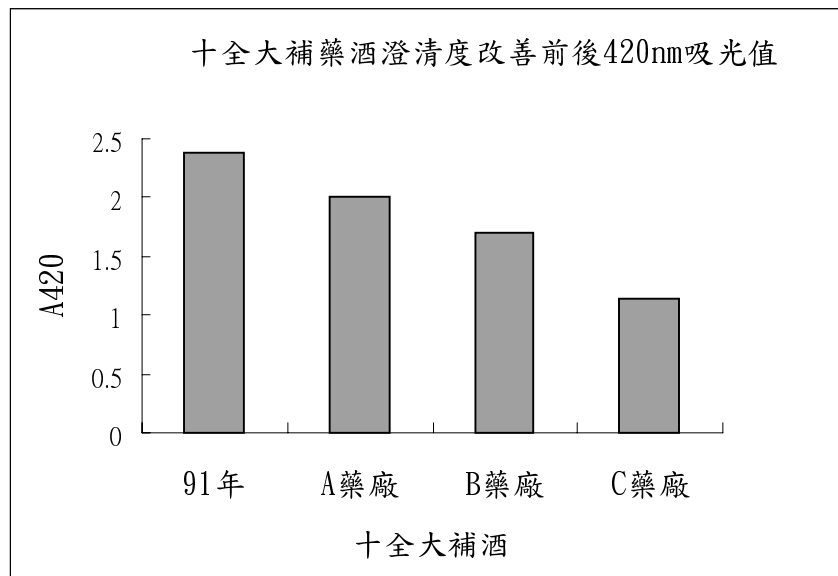


圖 5. 十全大補藥酒之澄清度於改善前後吸光值之比較

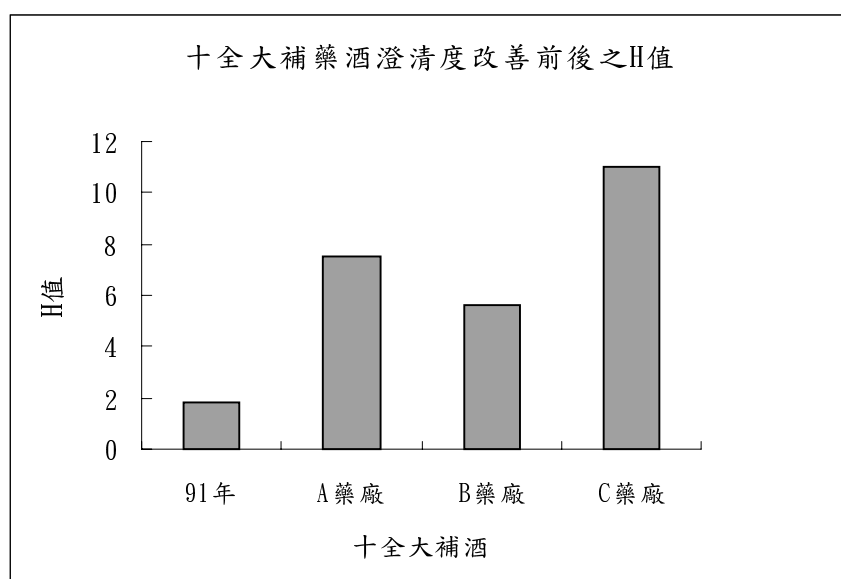
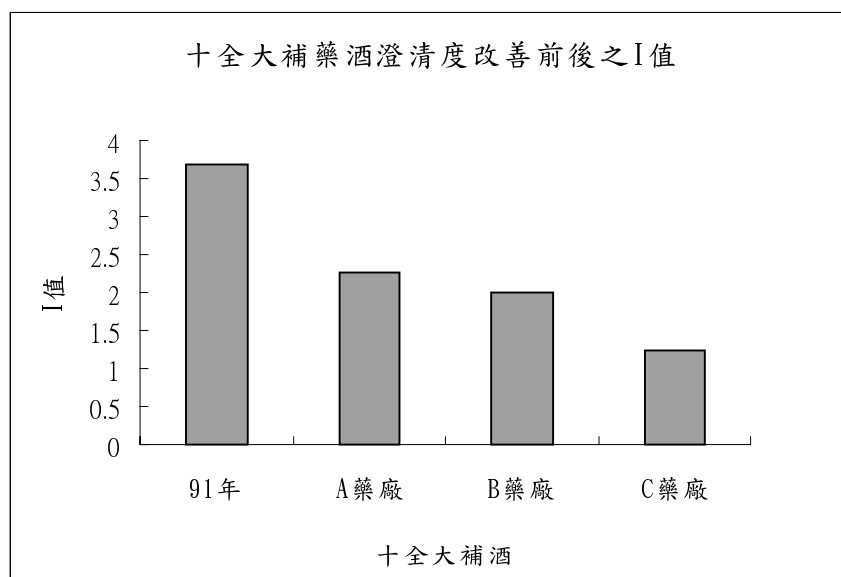


圖 6. 十全大補藥酒之澄清度於改善前後色度及色調之比較

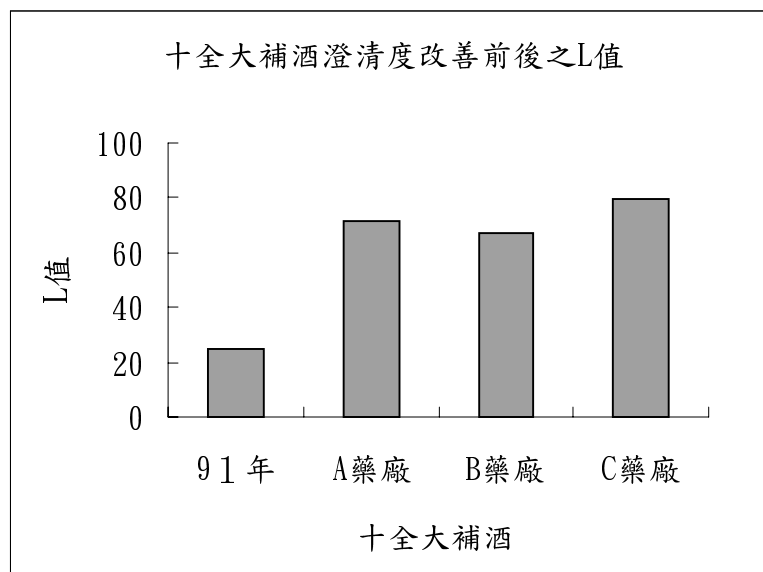
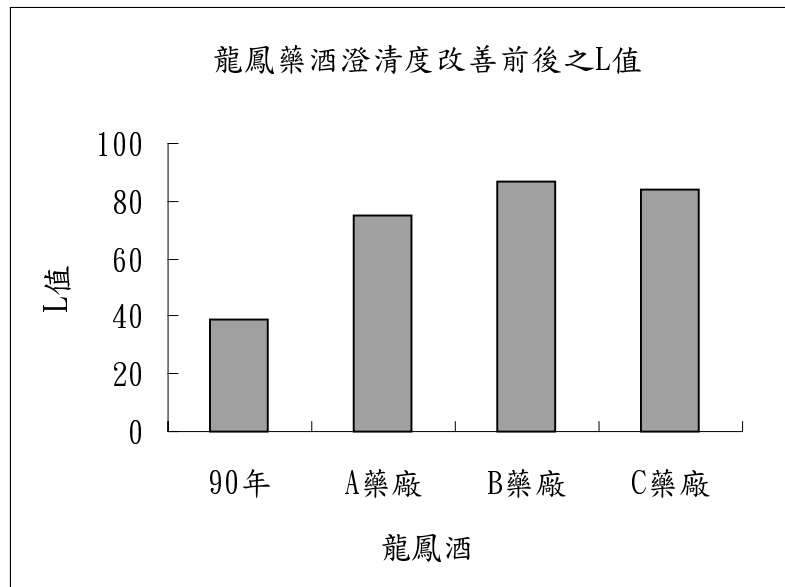


圖 7. 龍鳳及十全大補藥酒之澄清度於改善前後 L 值之比較

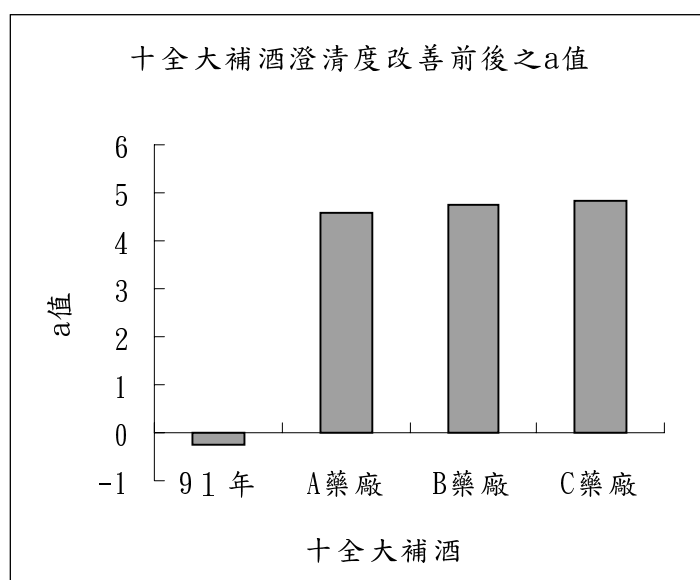
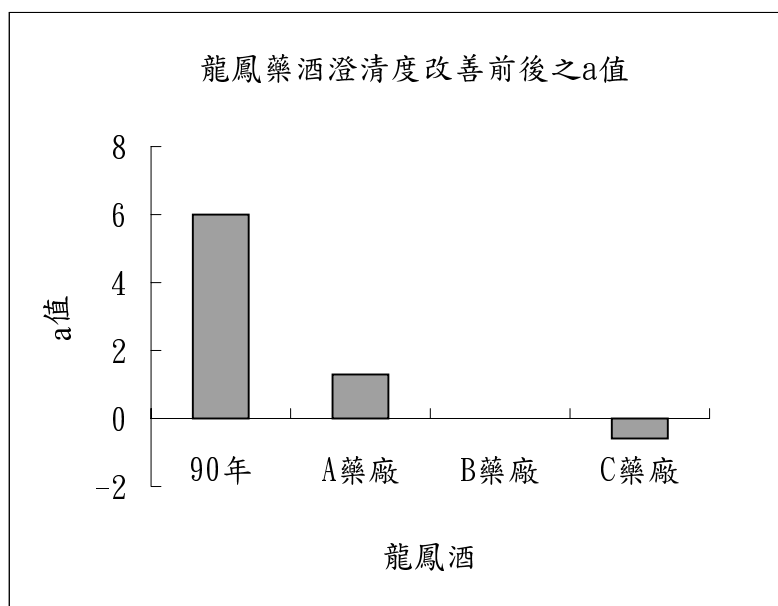


圖 8. 龍鳳及十全大補藥酒之澄清度於改善前後 a 值之比較

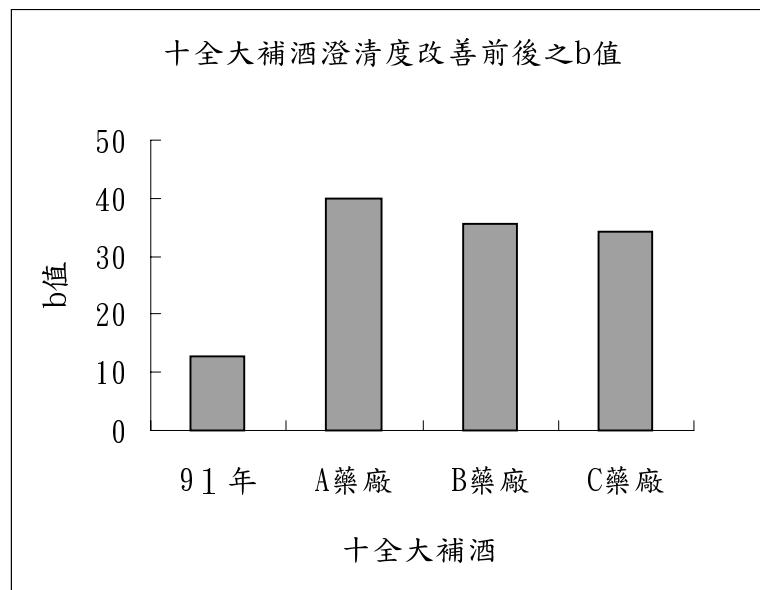
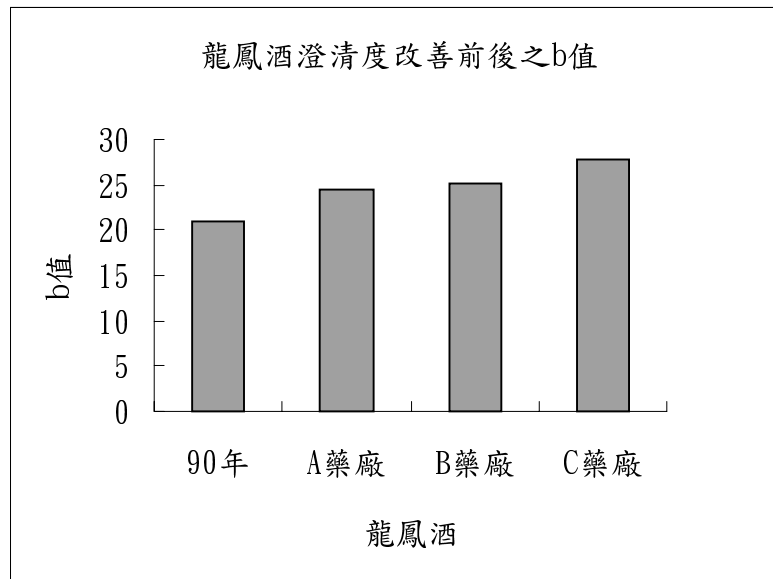


圖 9. 龍鳳及十全大補藥酒之澄清度於改善前後 b 值之比較

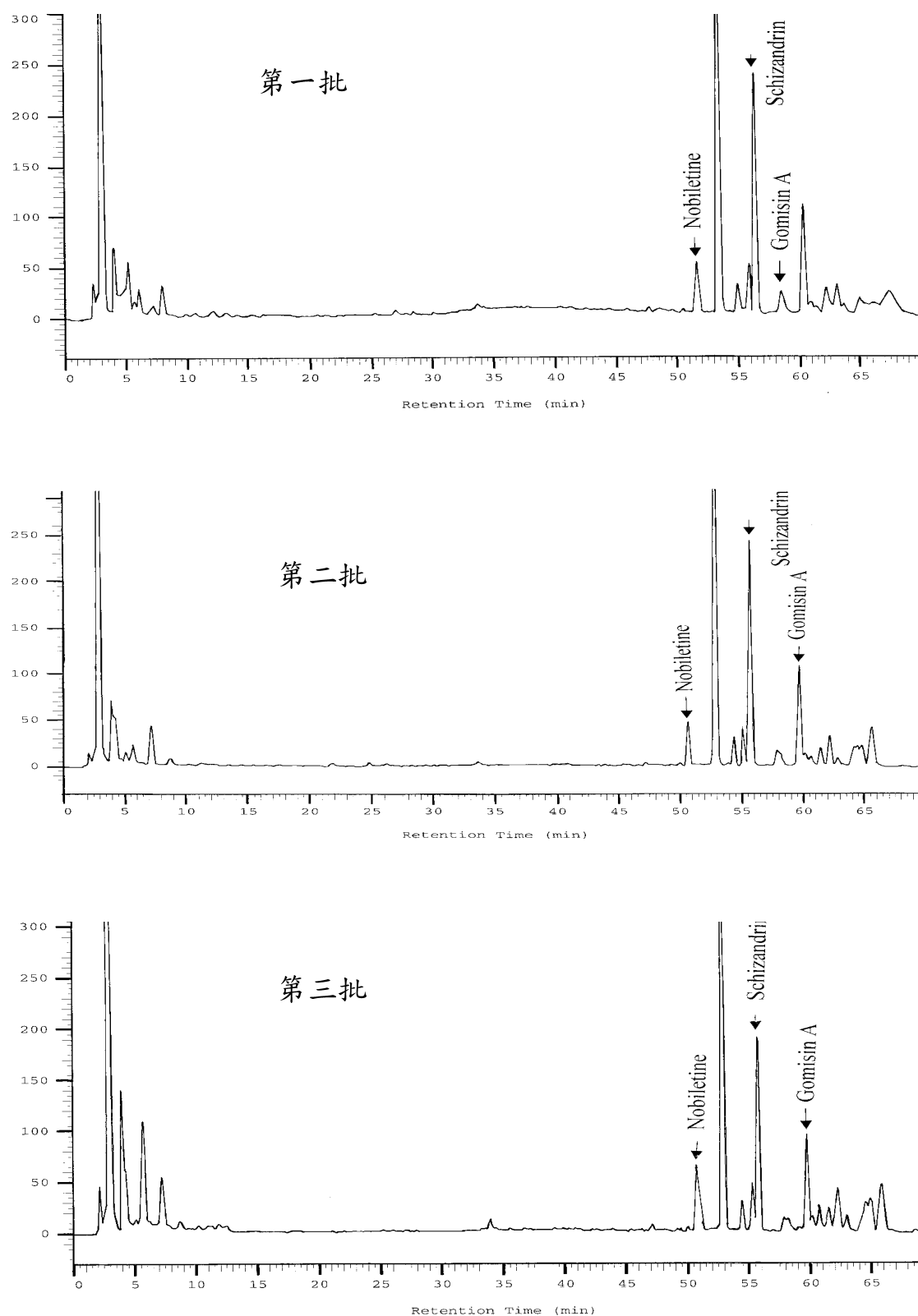


圖 28. 五味子藥材之 HPLC 層析圖

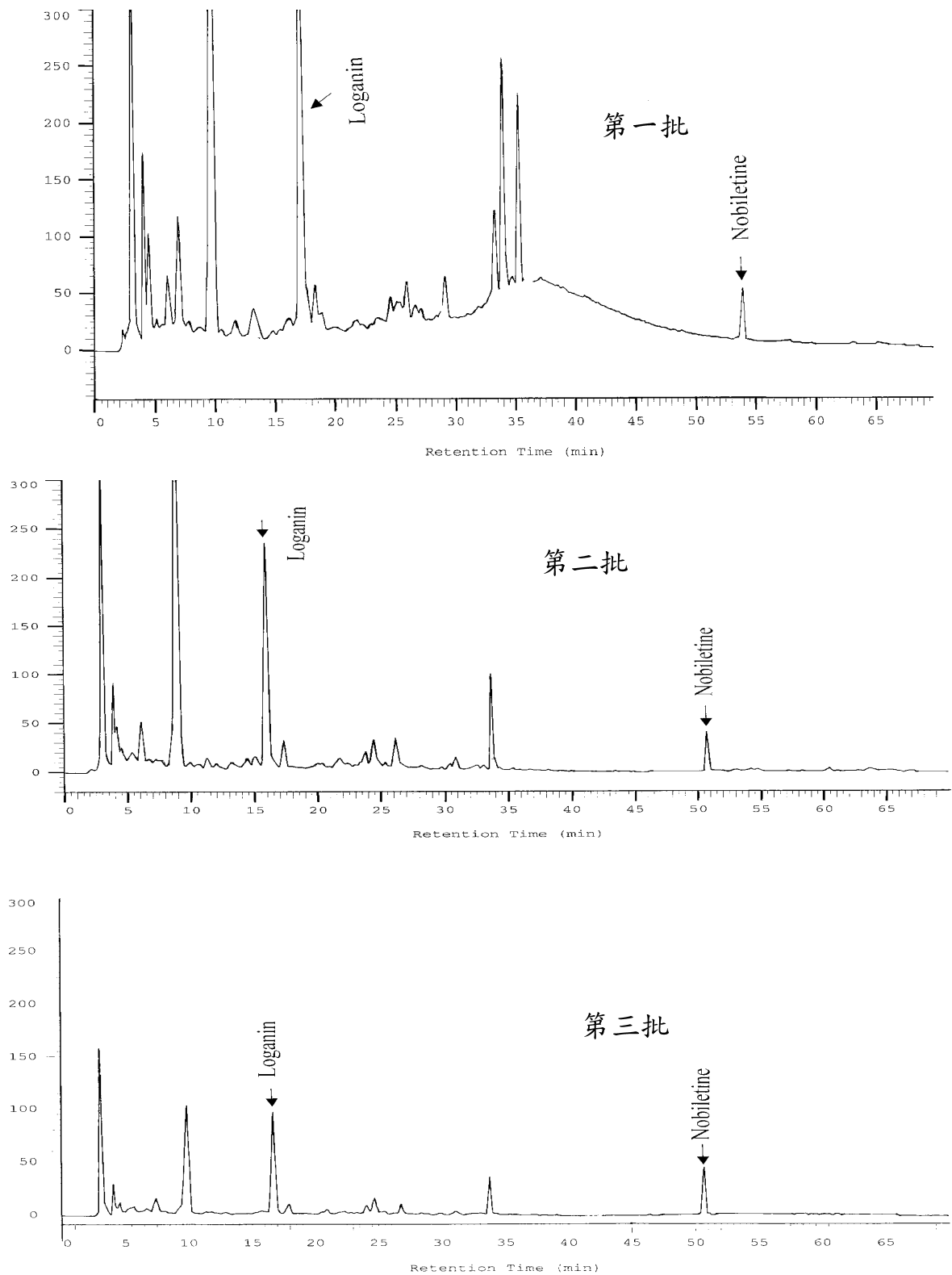


圖 29. 山莢肉藥材之 HPLC 層析圖

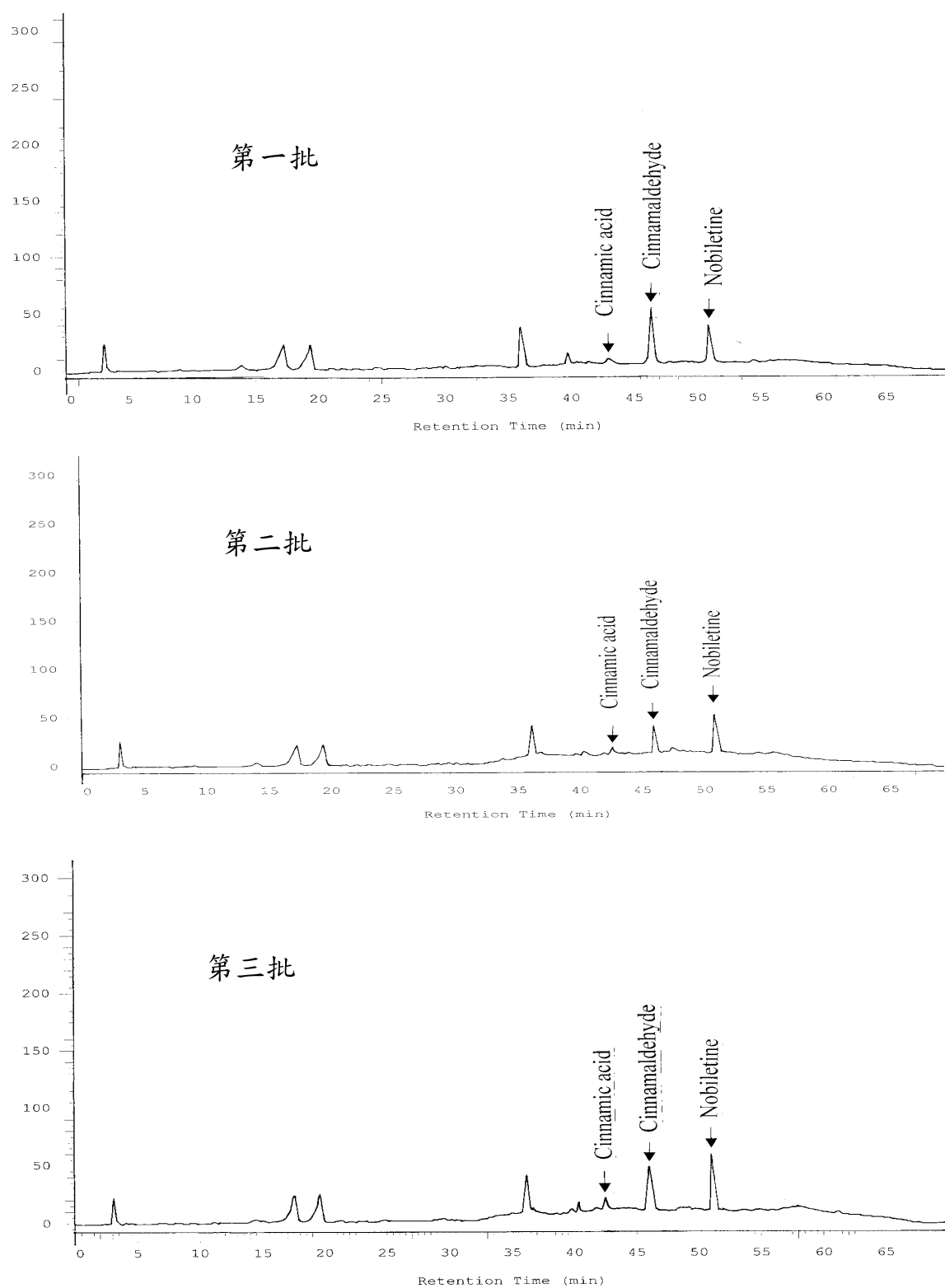


圖 30. 肉桂藥材之 HPLC 層析圖

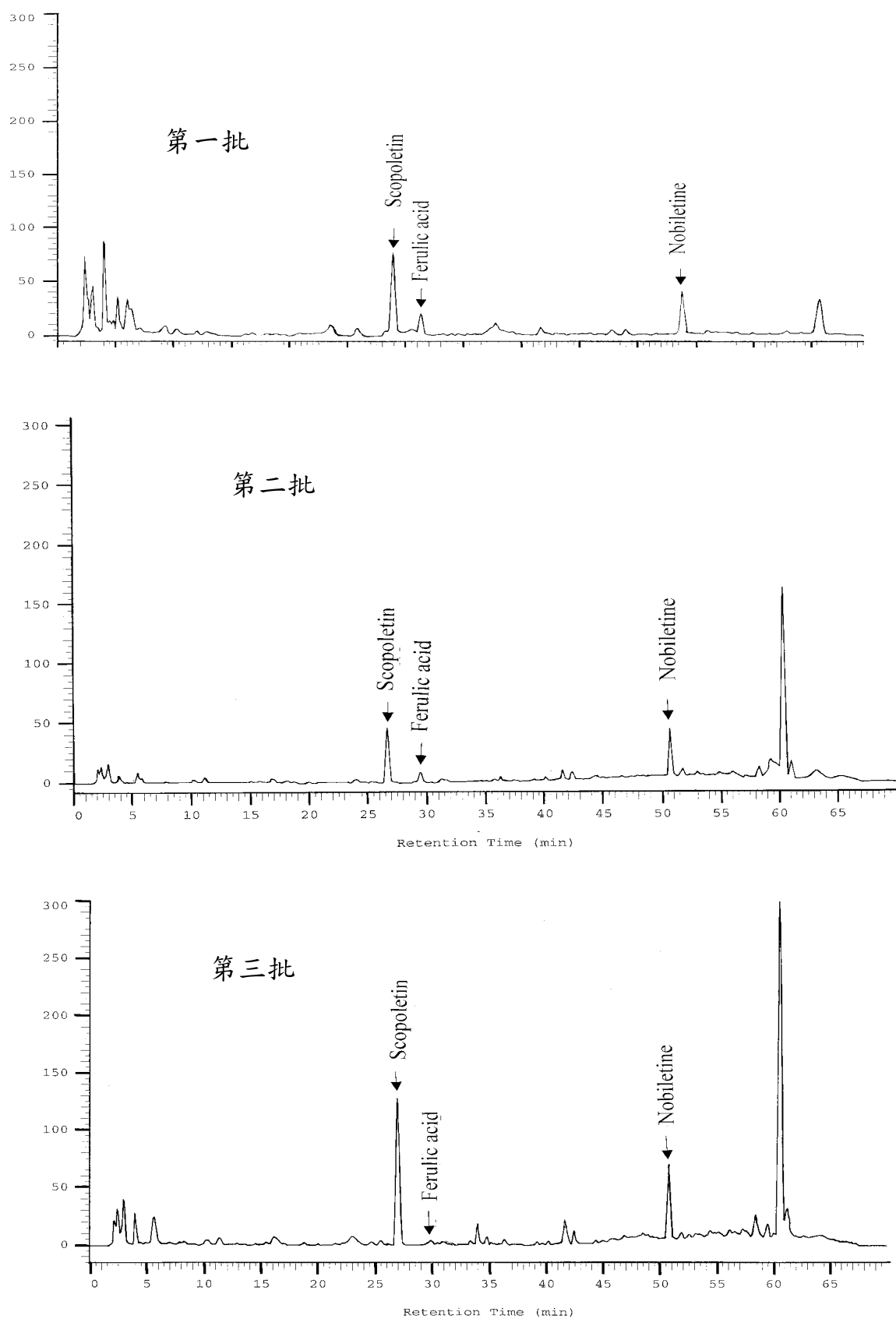


圖 31. 當歸藥材之 HPLC 層析圖

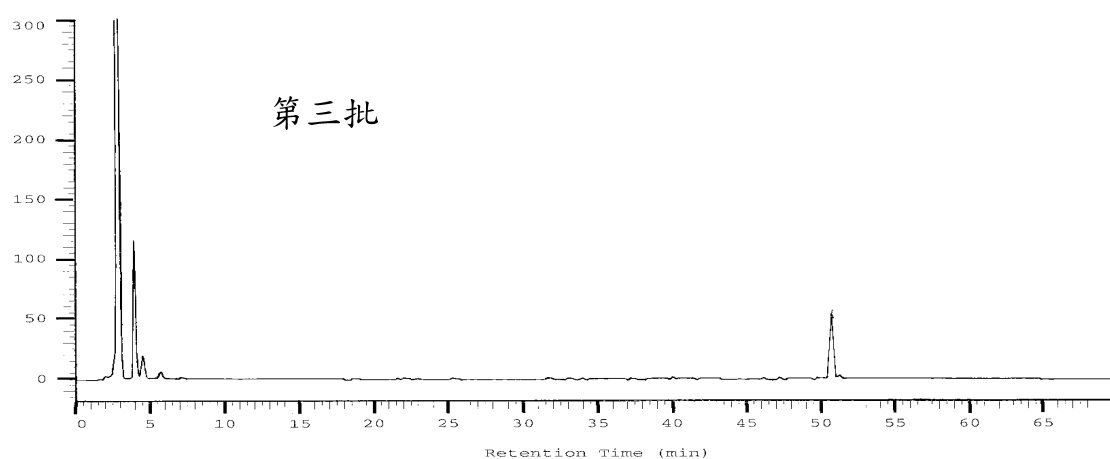
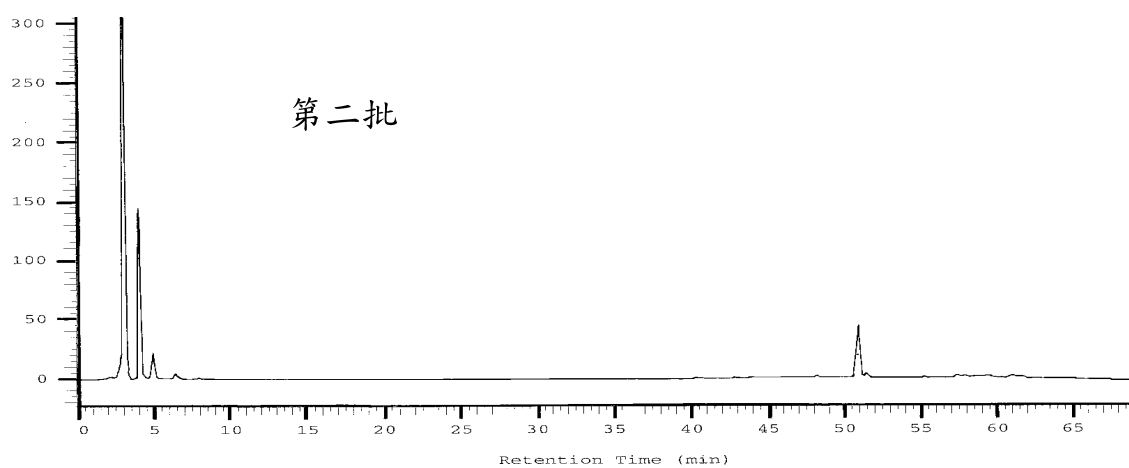
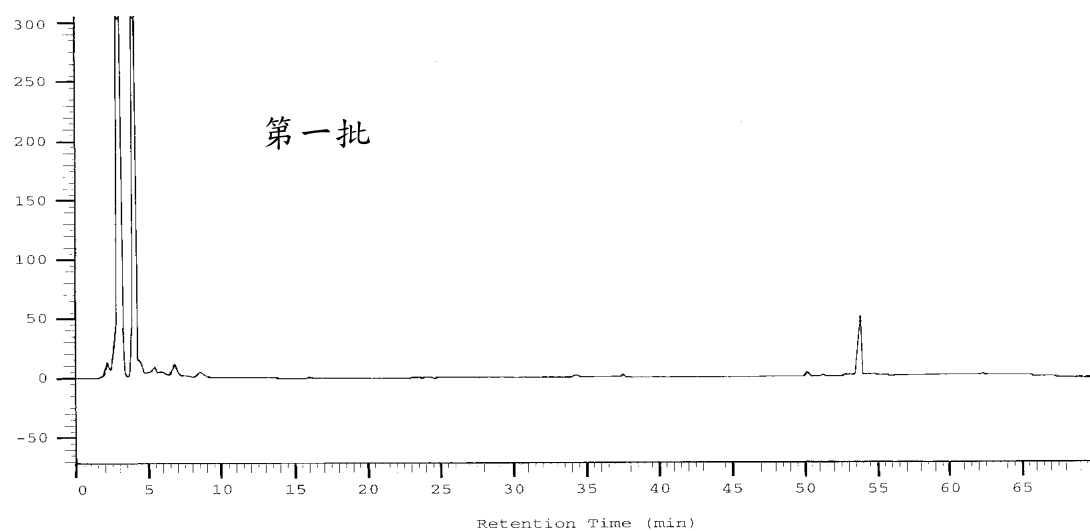


圖 32. 巴戟天藥材之 HPLC 層析圖

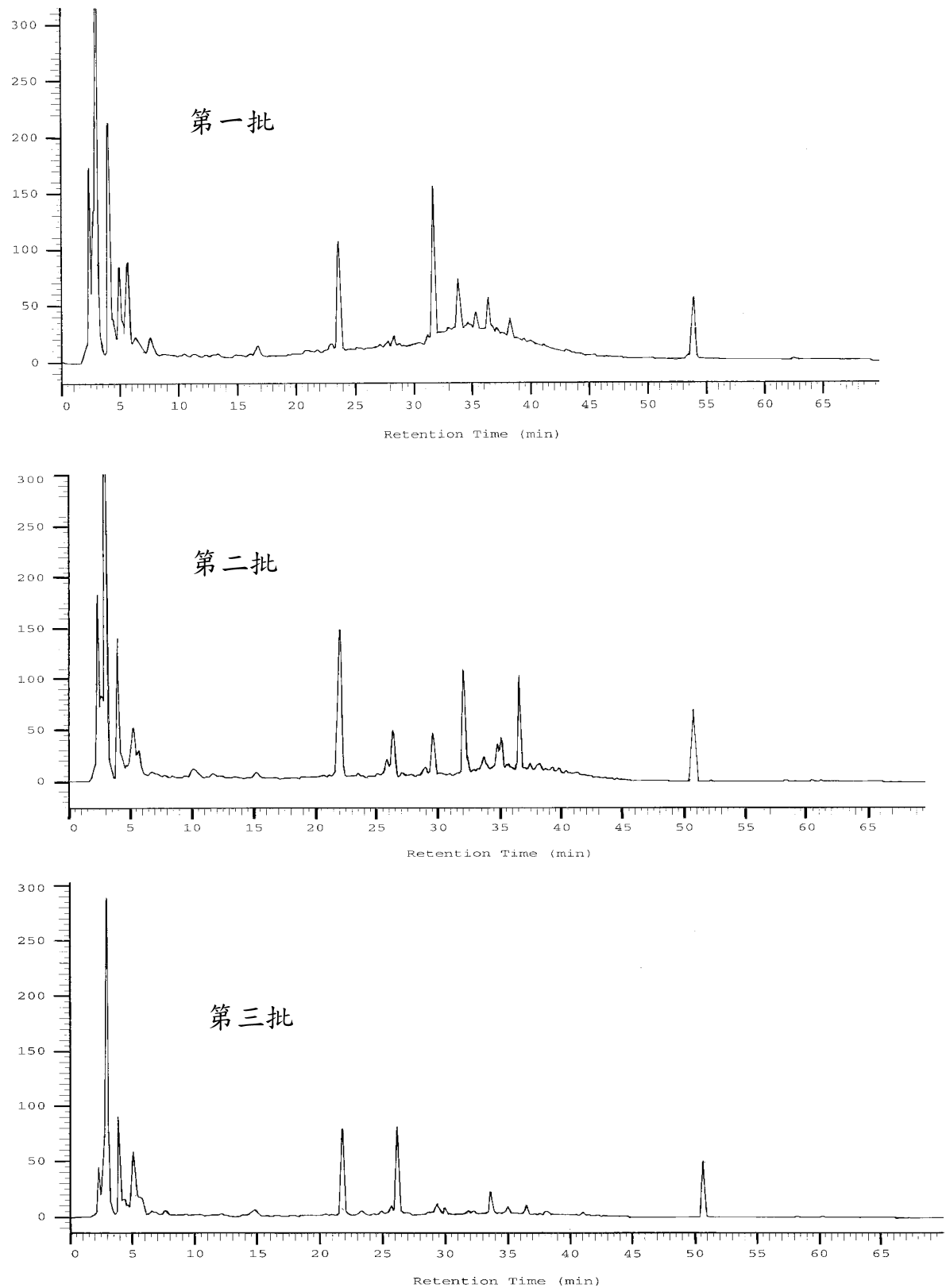
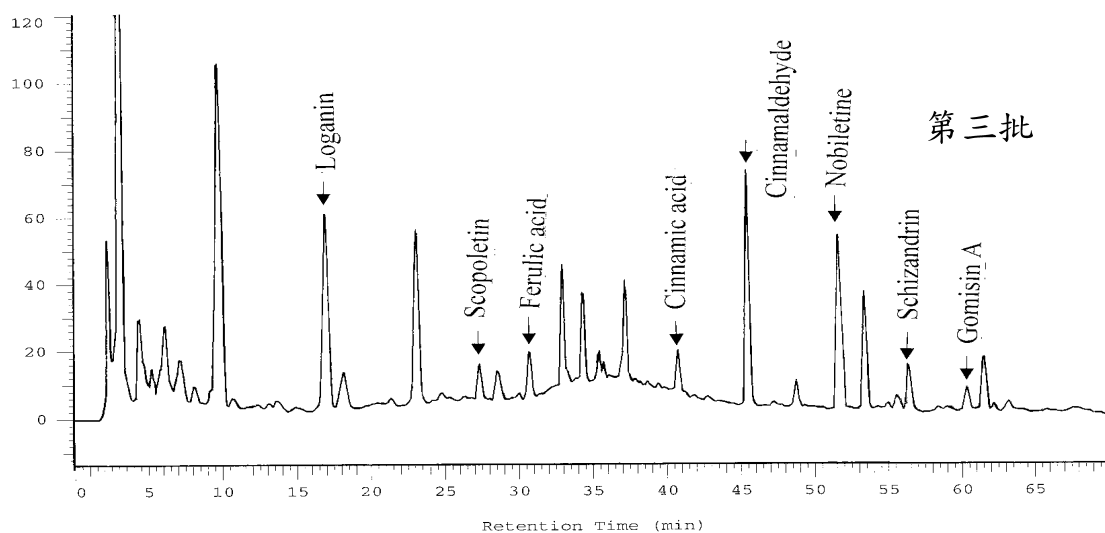
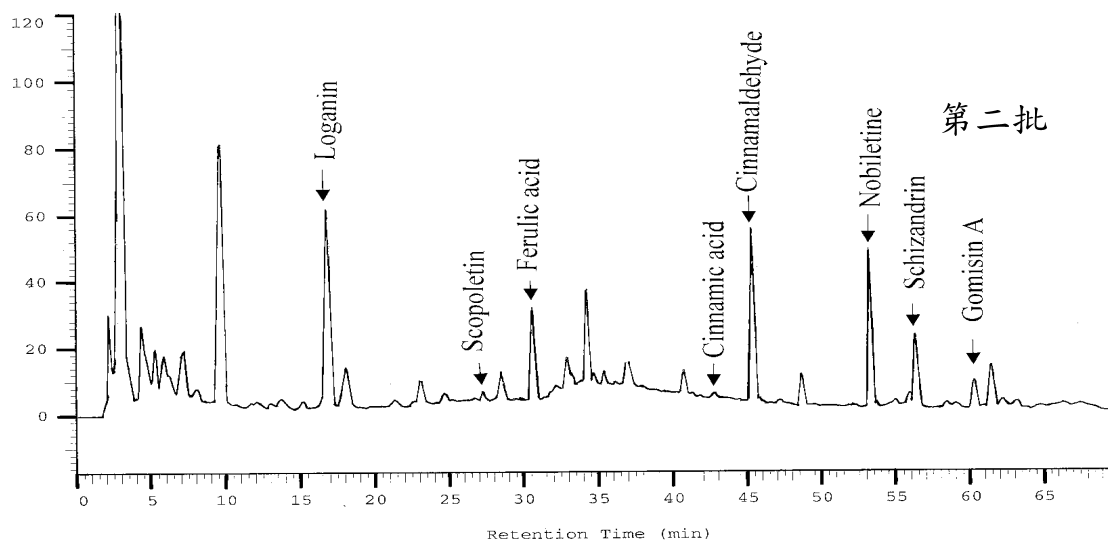
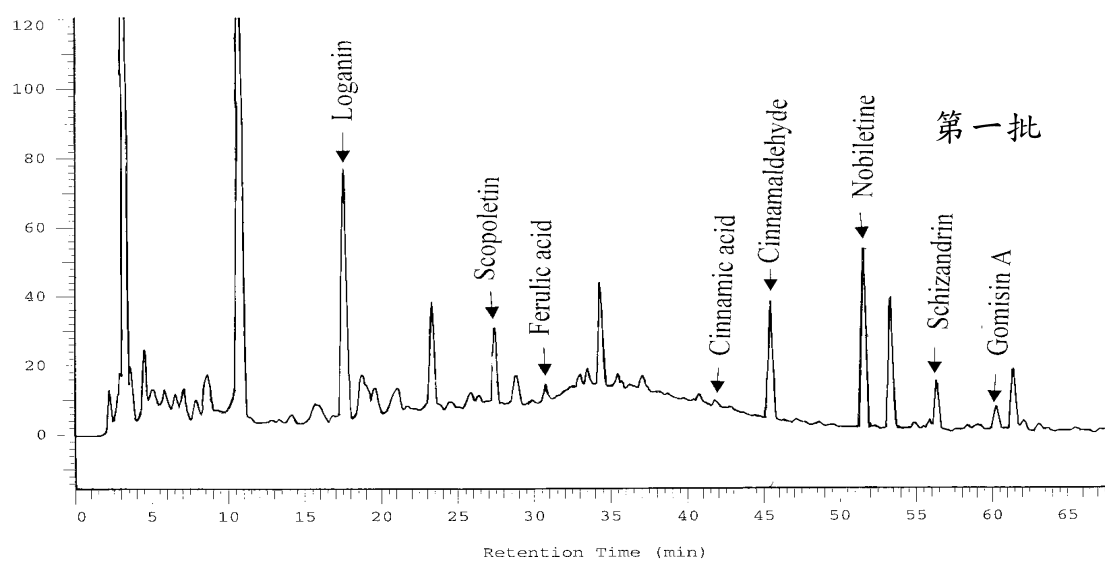


圖 33. 肉蓯蓉藥材之 HPLC 層析圖



圖

34. 金門龍鳳酒一個月半成品之 HPLC 層析圖

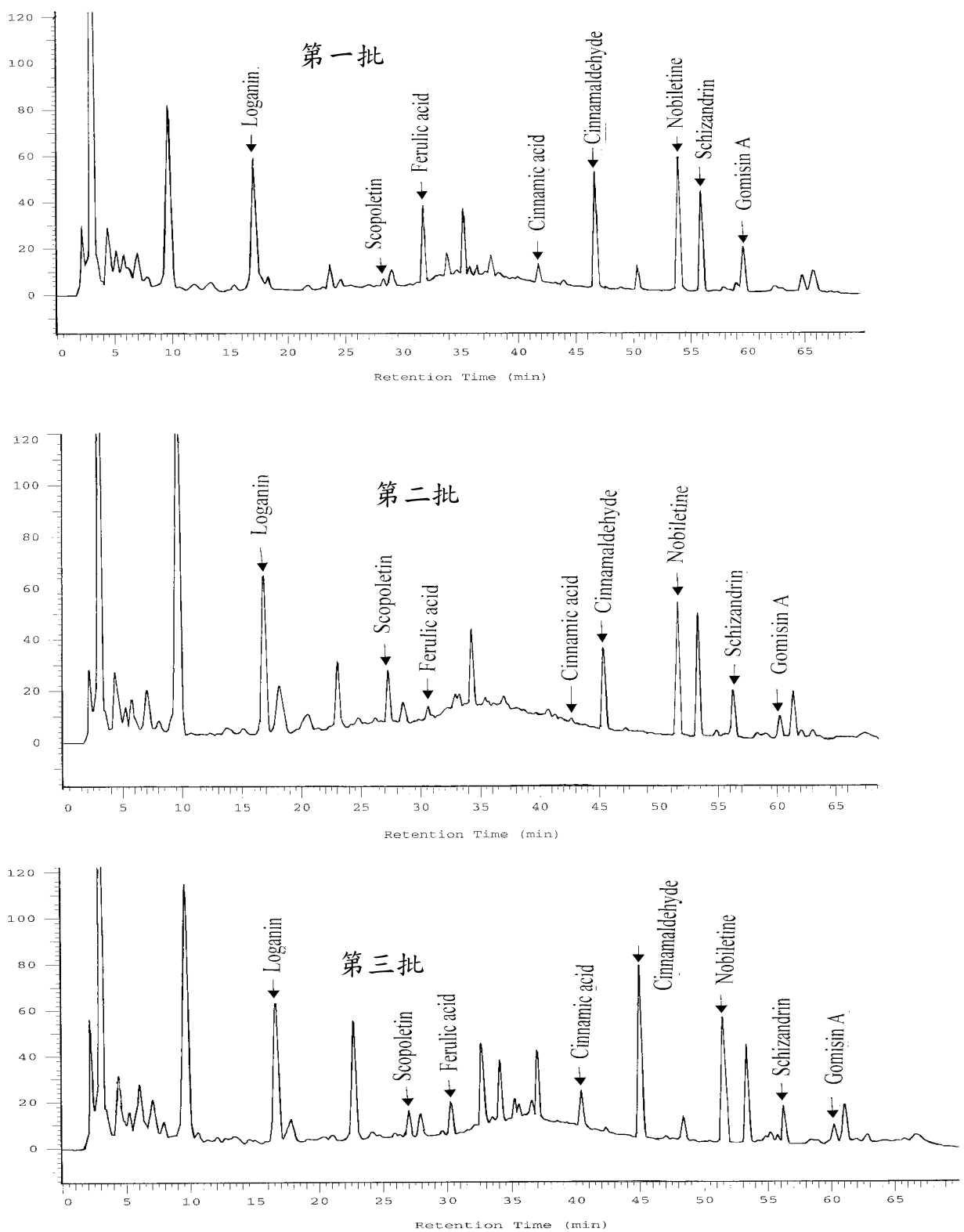


圖 35. 金門龍鳳酒二個月半成品之 HPLC 層析圖

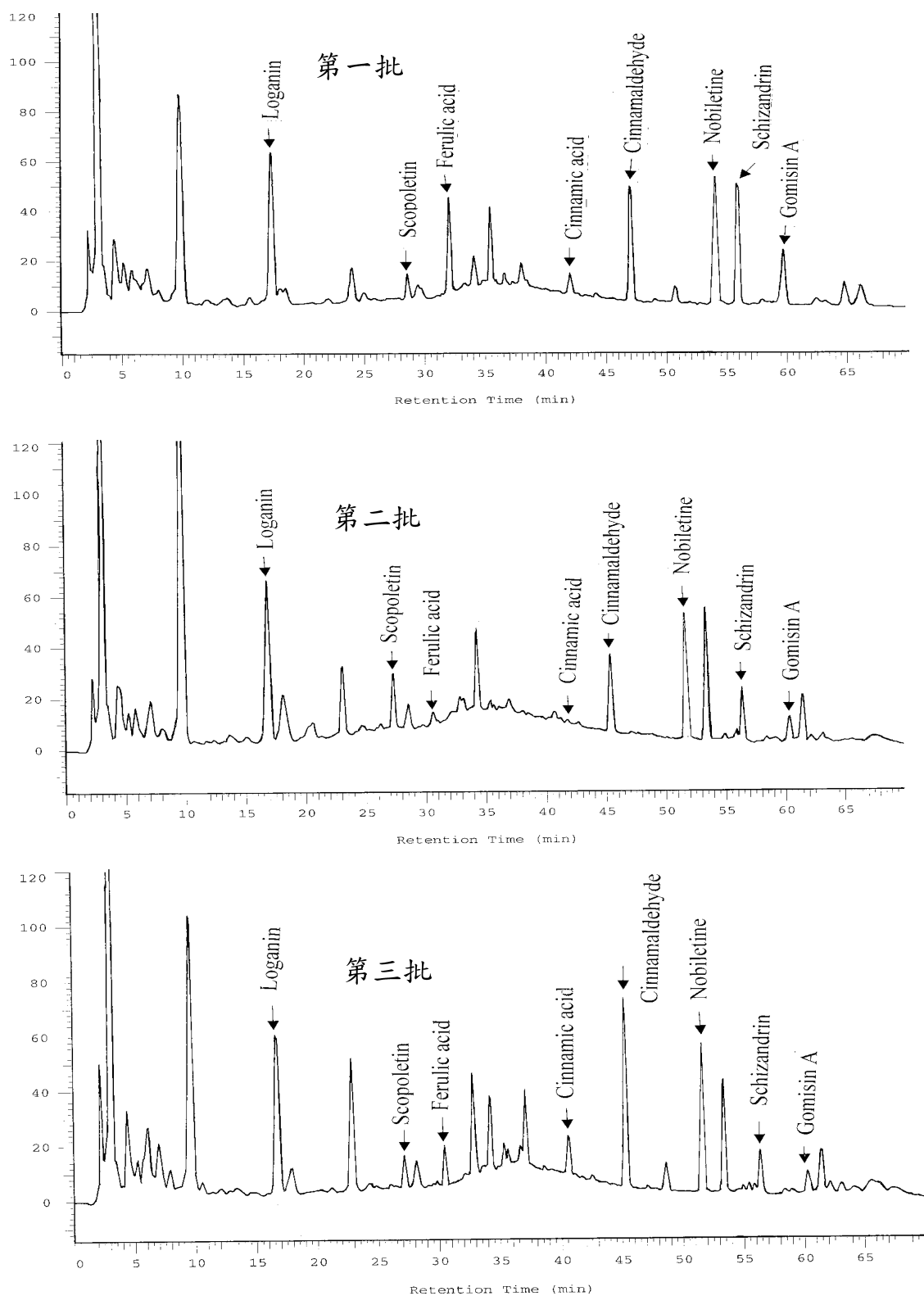


圖 36. 金門龍鳳酒三個月半成品之 HPLC 層析圖

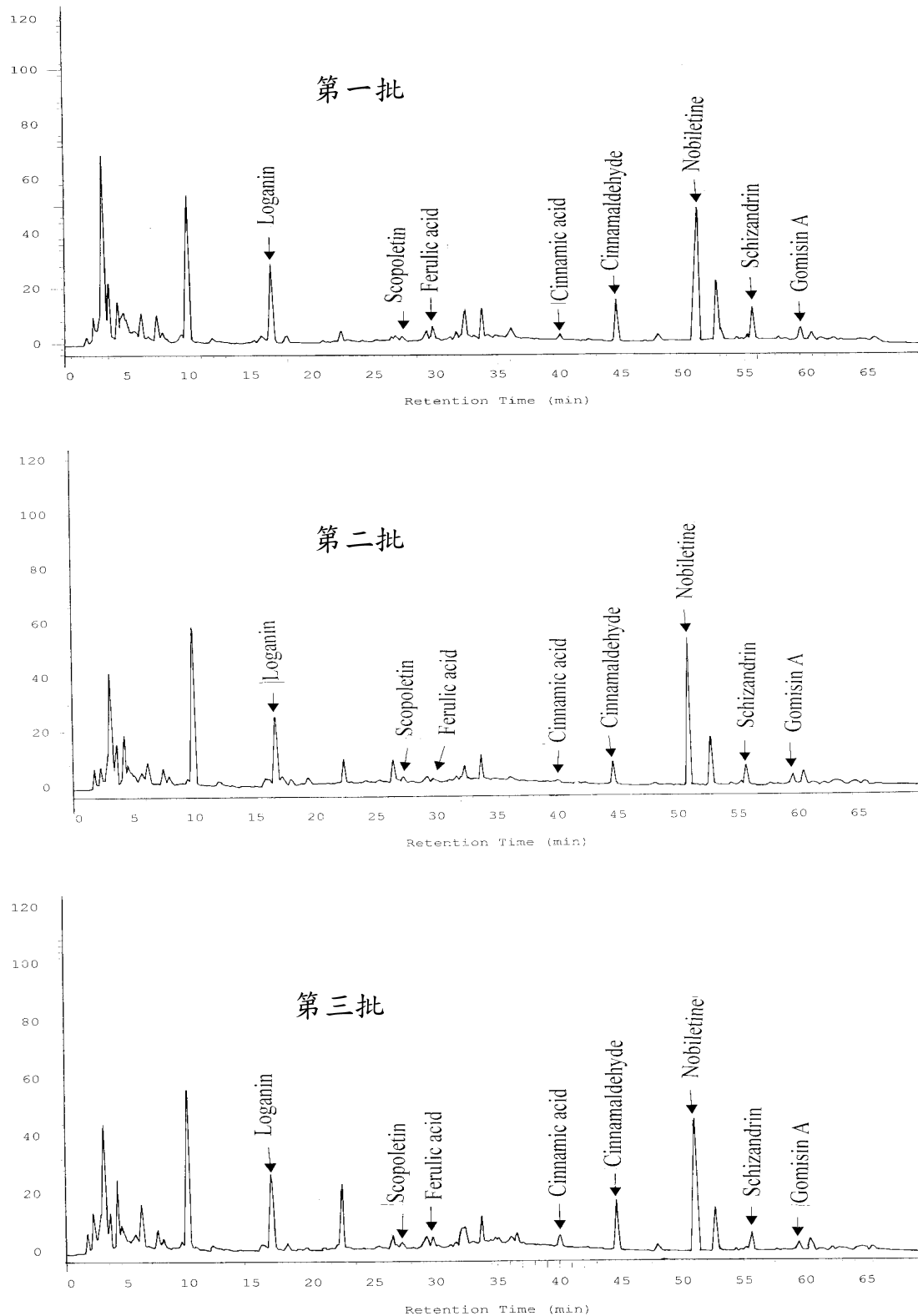


圖 37. 金門龍鳳酒成品之 HPLC 層析圖

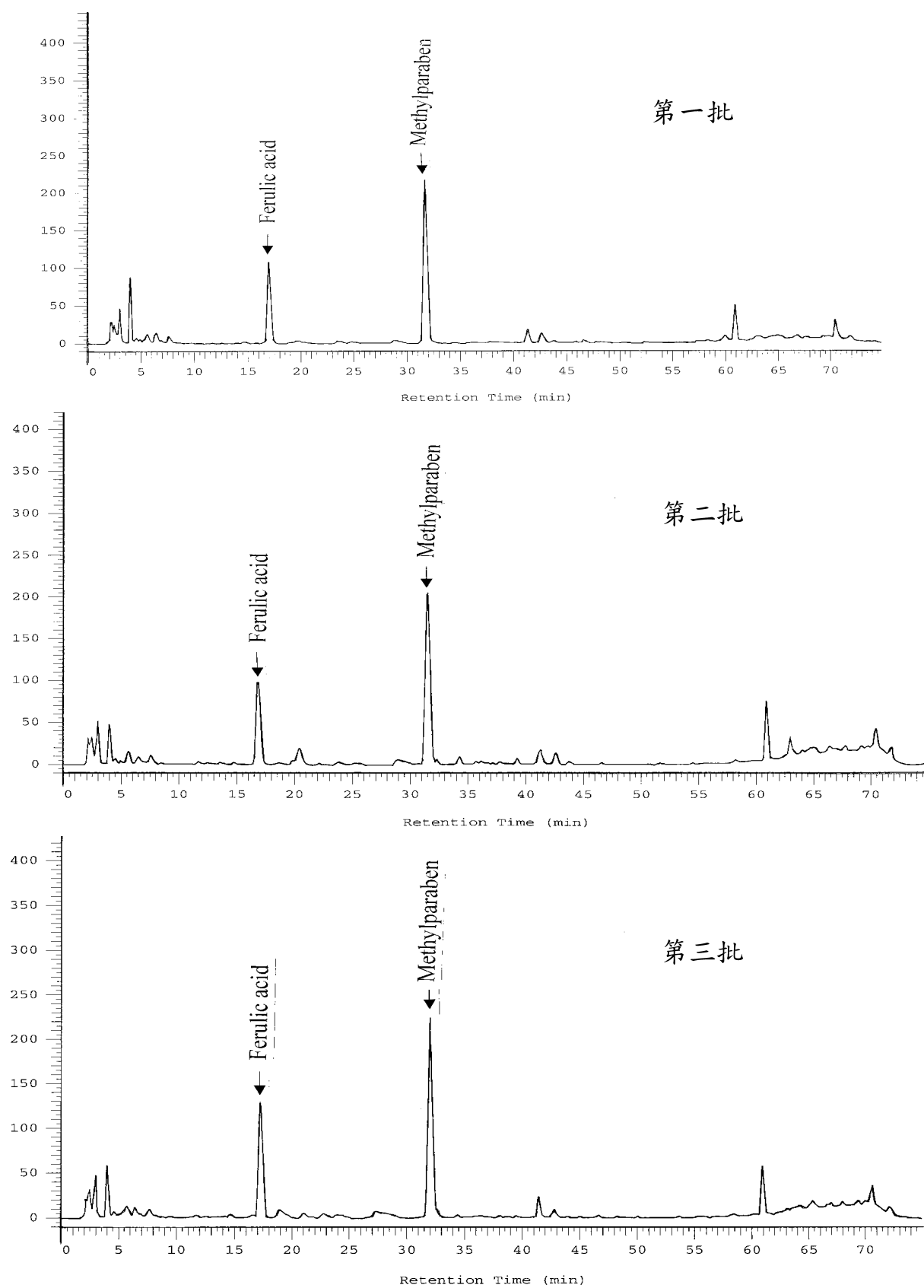


圖 38. 當歸藥材之 HPLC 層析圖

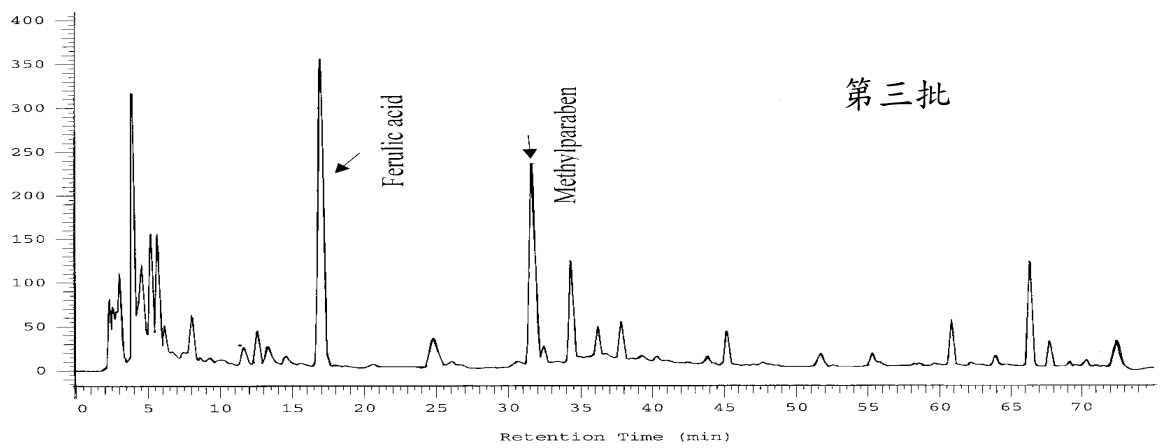
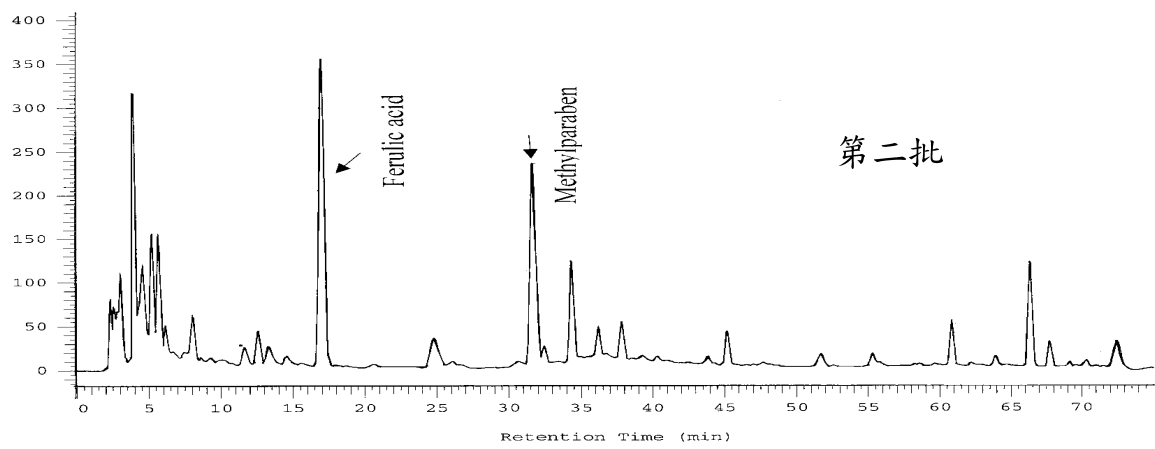
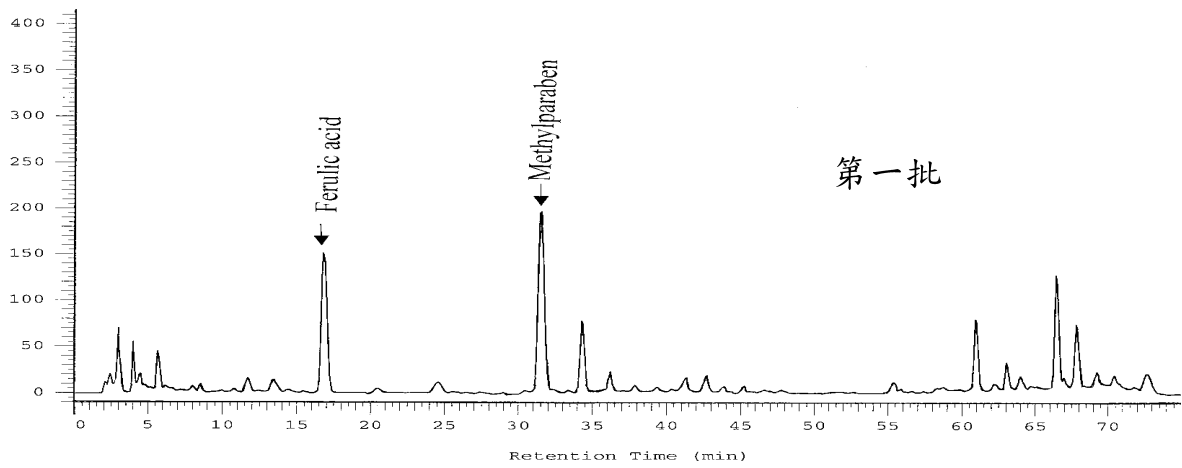


圖 39. 川芎藥材之 HPLC 層析圖

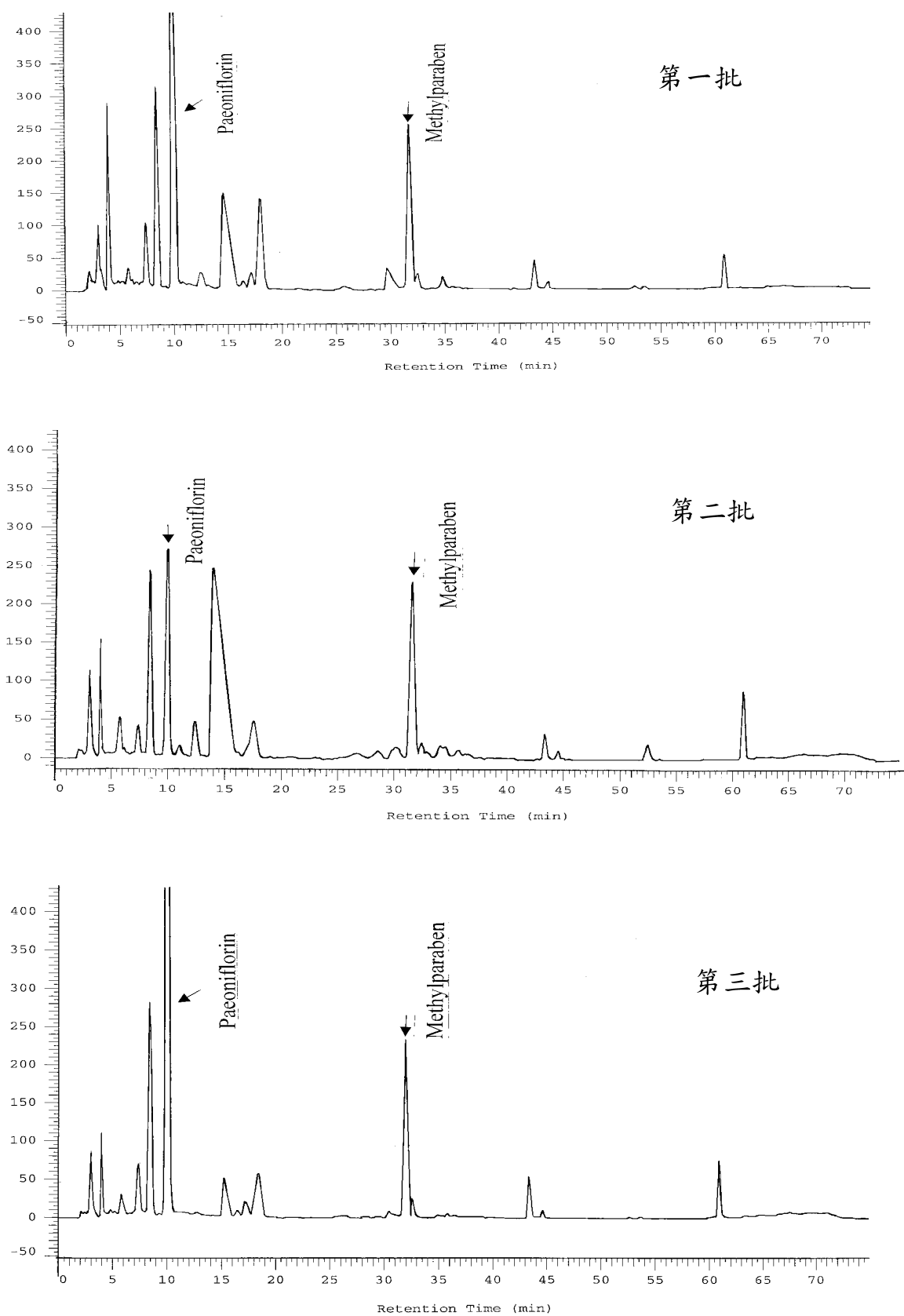


圖 40. 白芍藥材之 HPLC 層析圖

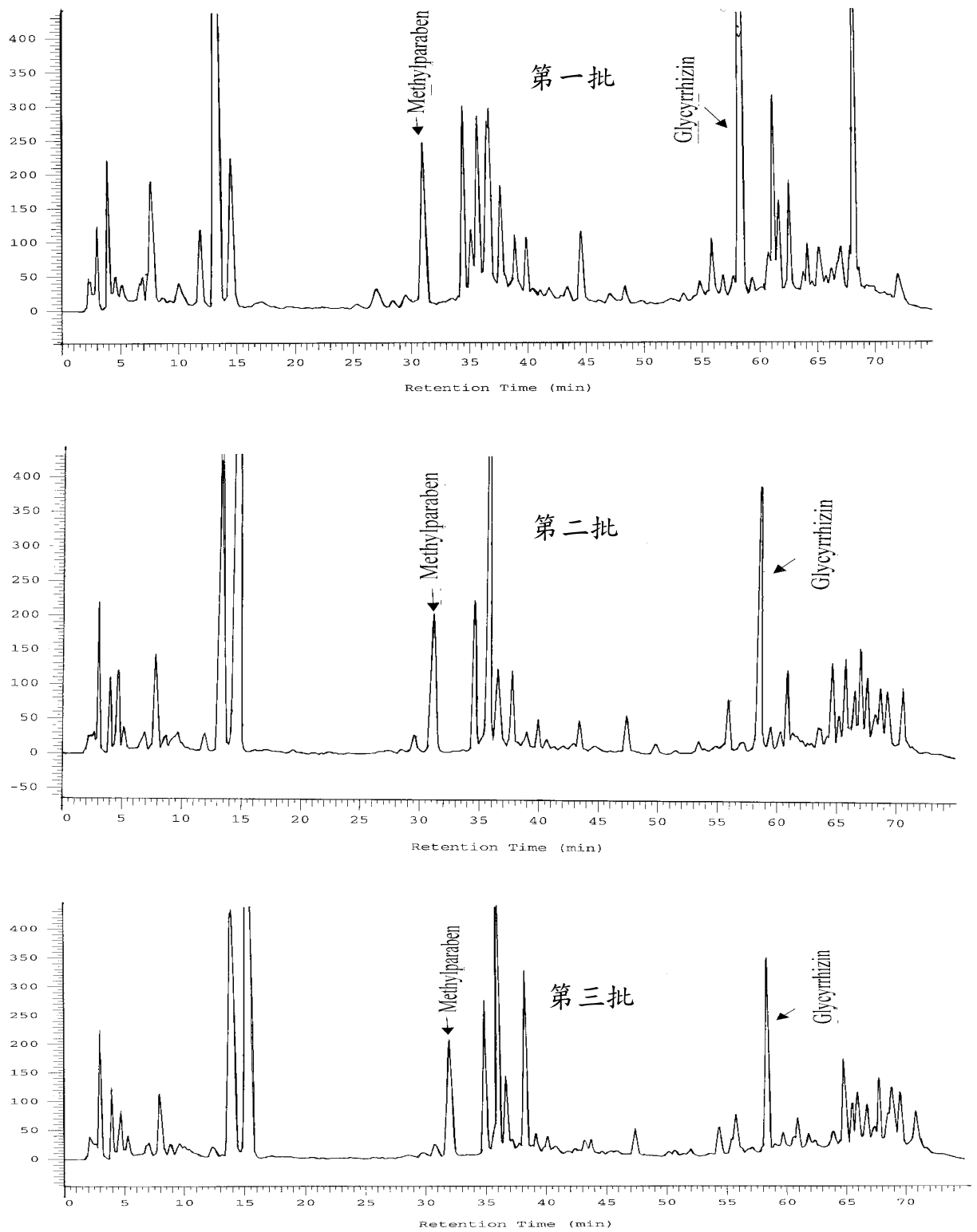


圖 41. 甘草藥材之 HPLC 層析圖

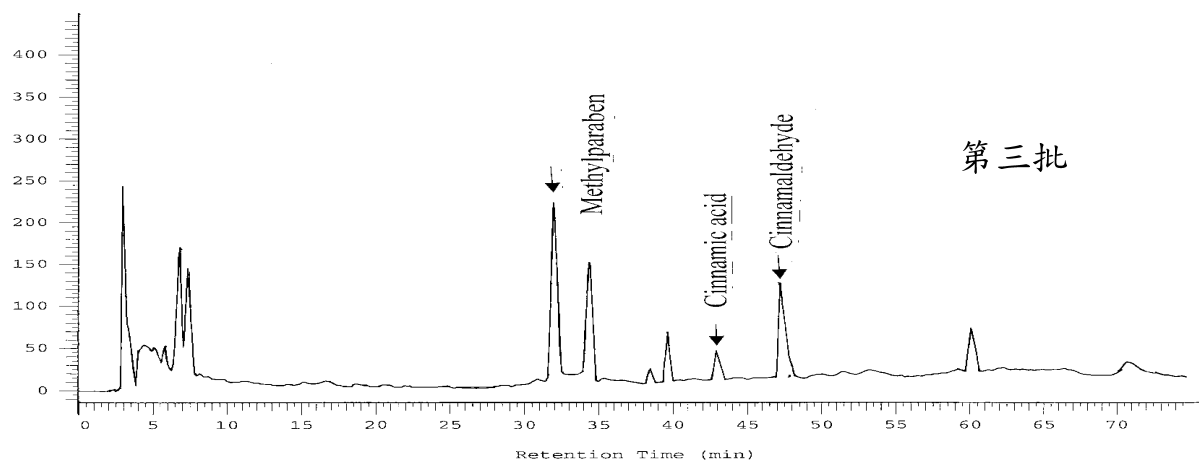
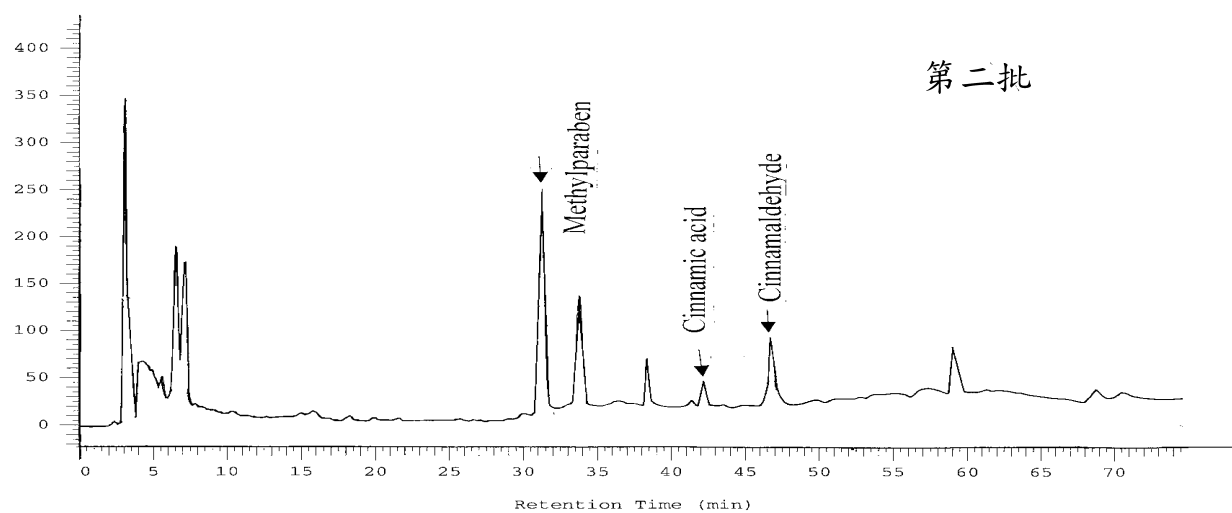
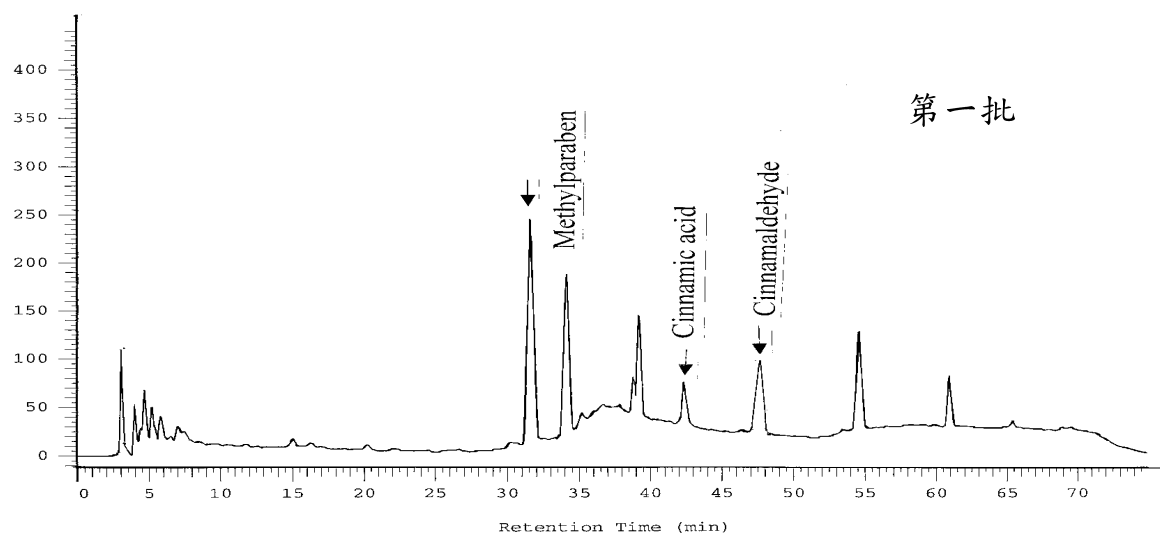


圖 42. 肉桂藥材之 HPLC 層析圖

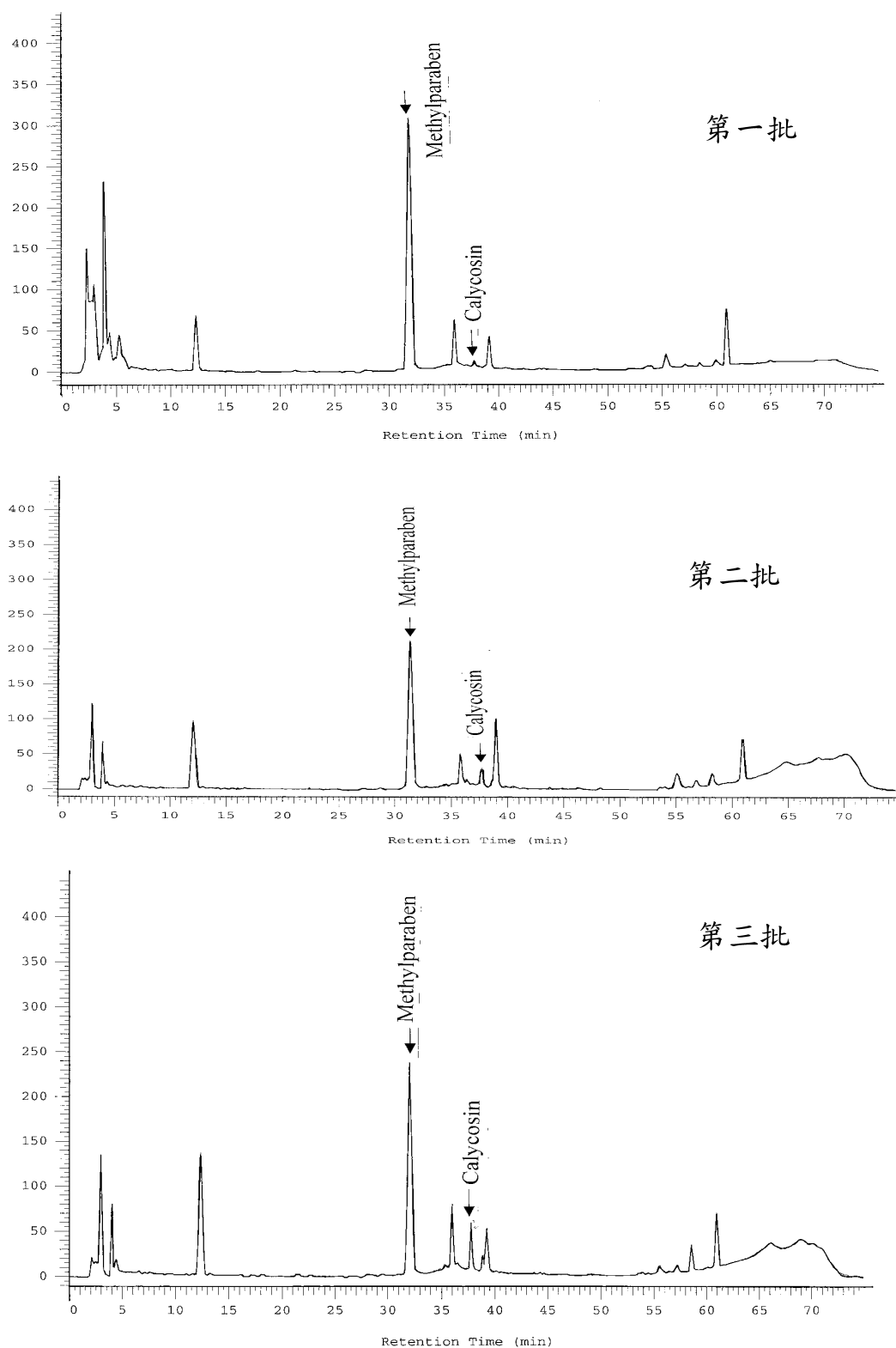


圖 43. 黃耆藥材之 HPLC 層析圖

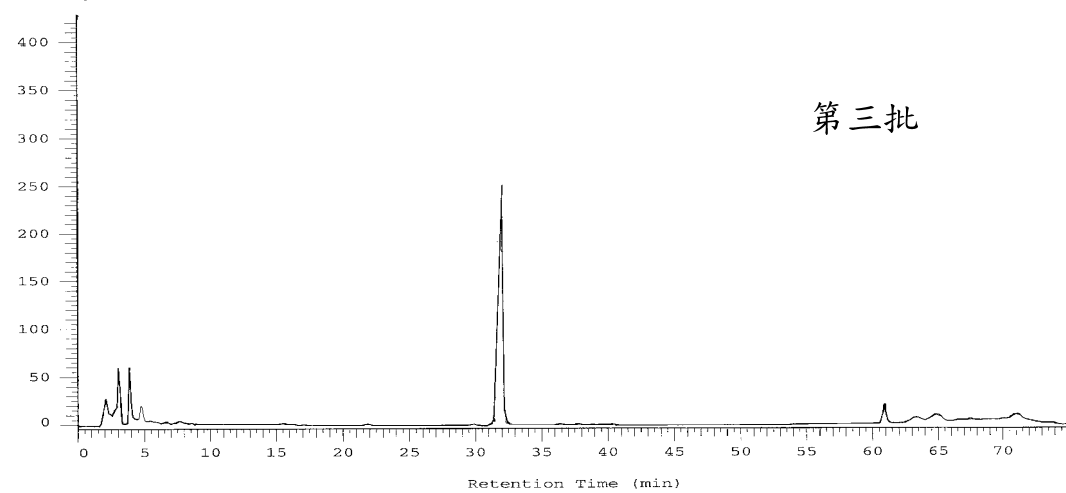
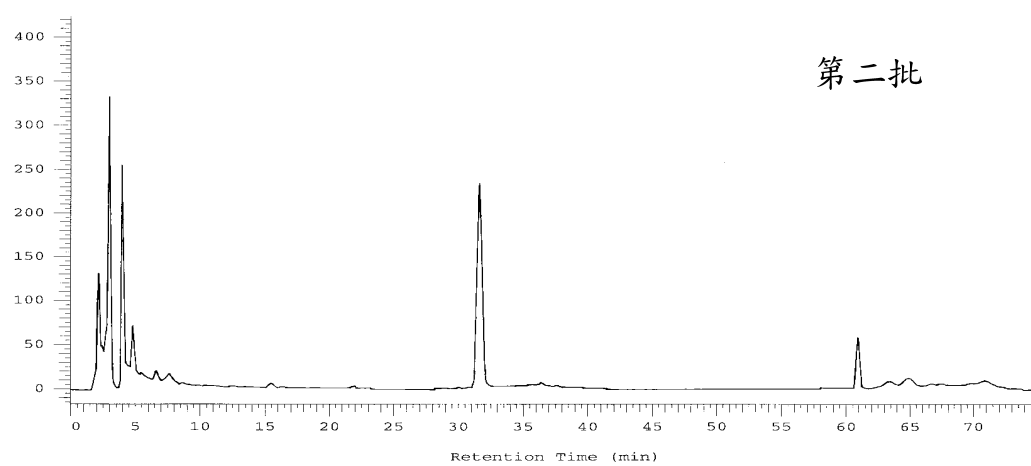
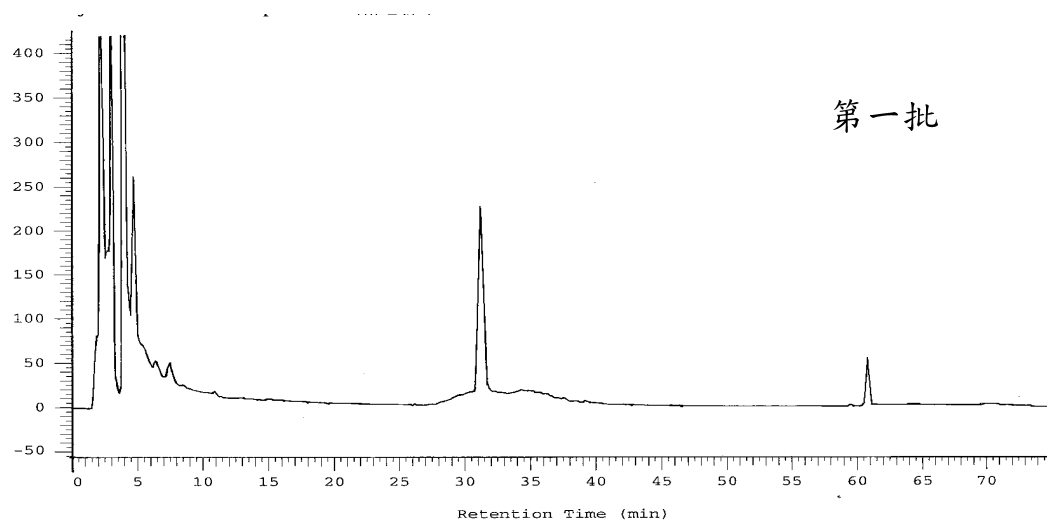


圖 44. 熟地黃藥材之 HPLC 層析圖

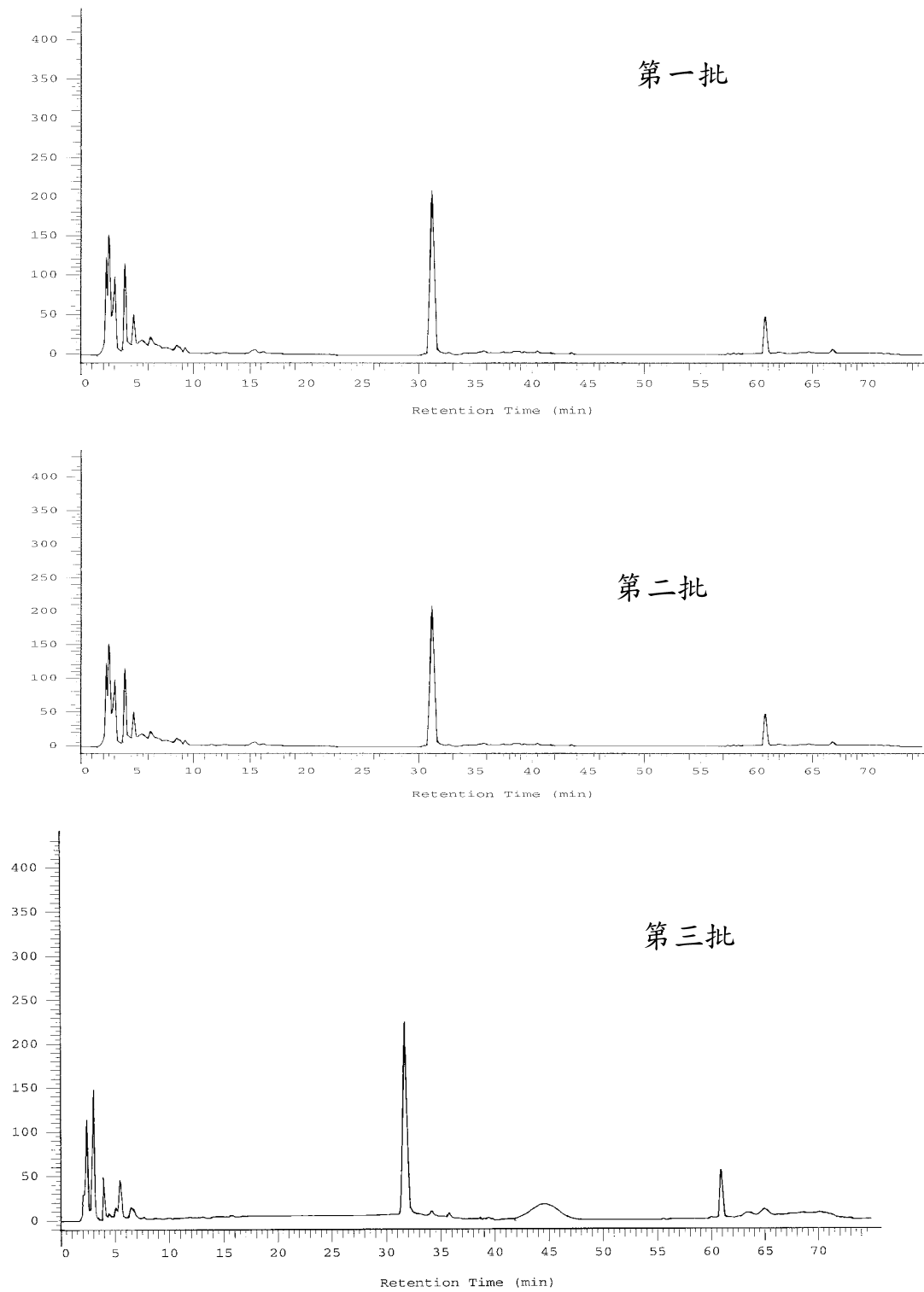


圖 45. 黨參藥材之 HPLC 層析圖

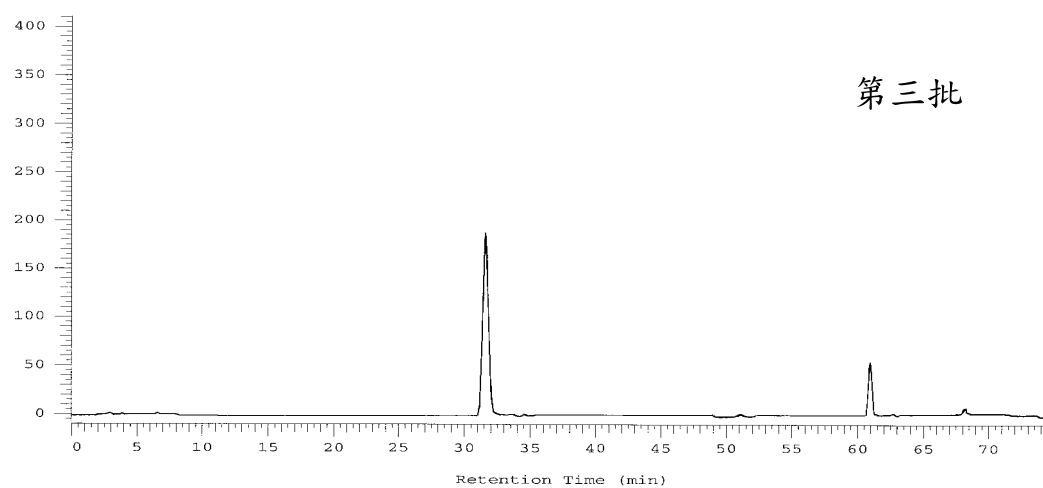
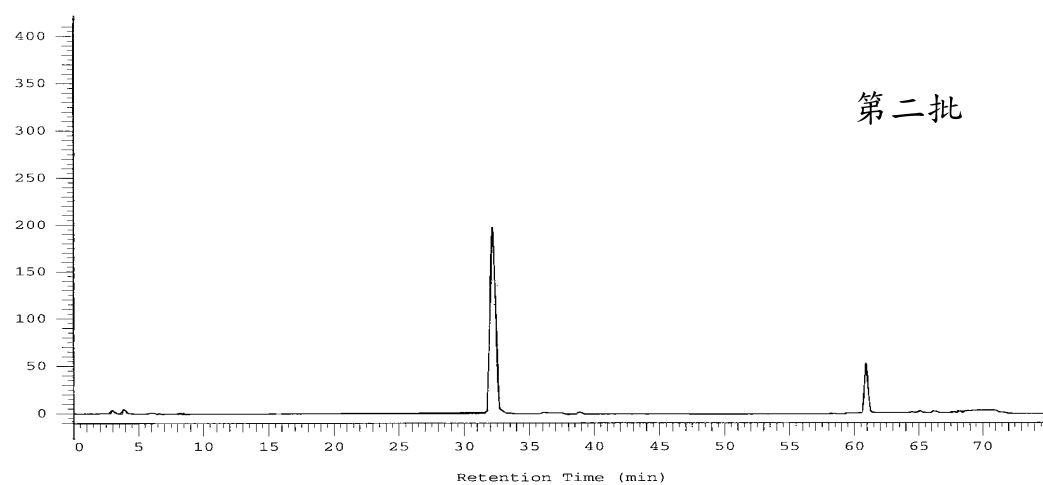
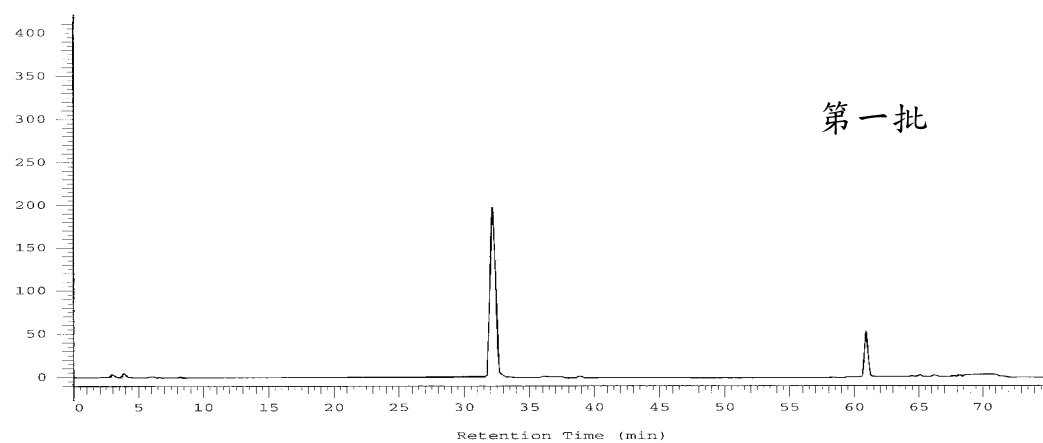


圖 46. 茯苓藥材之 HPLC 層析圖

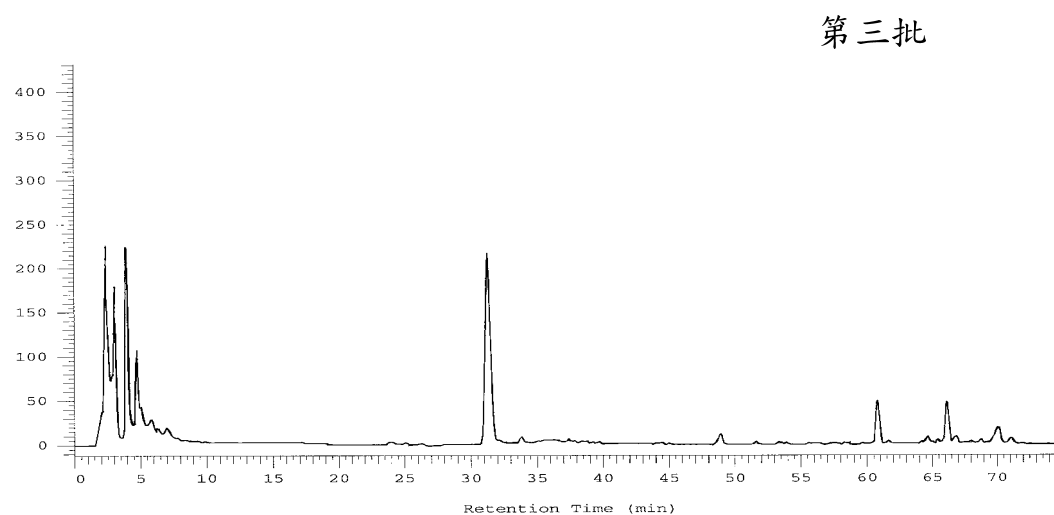
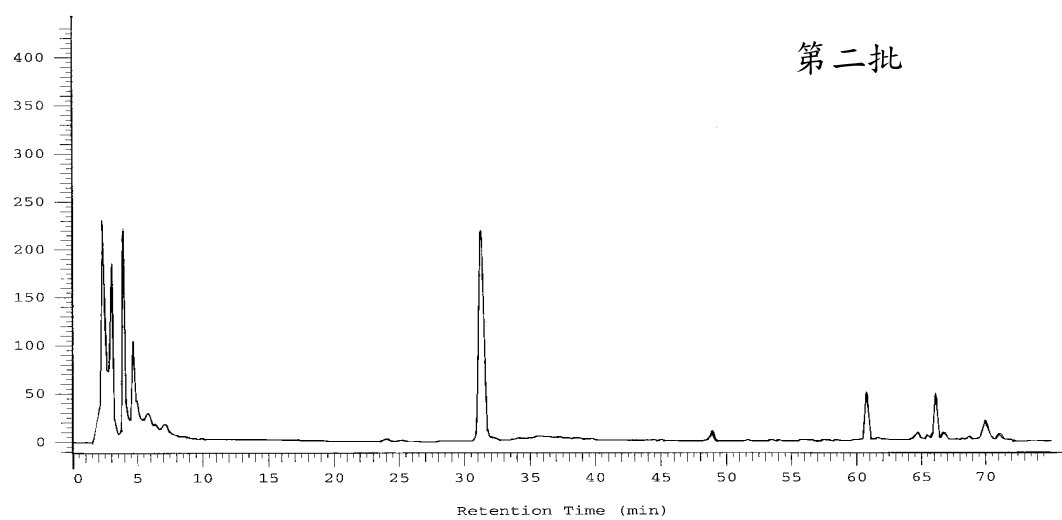
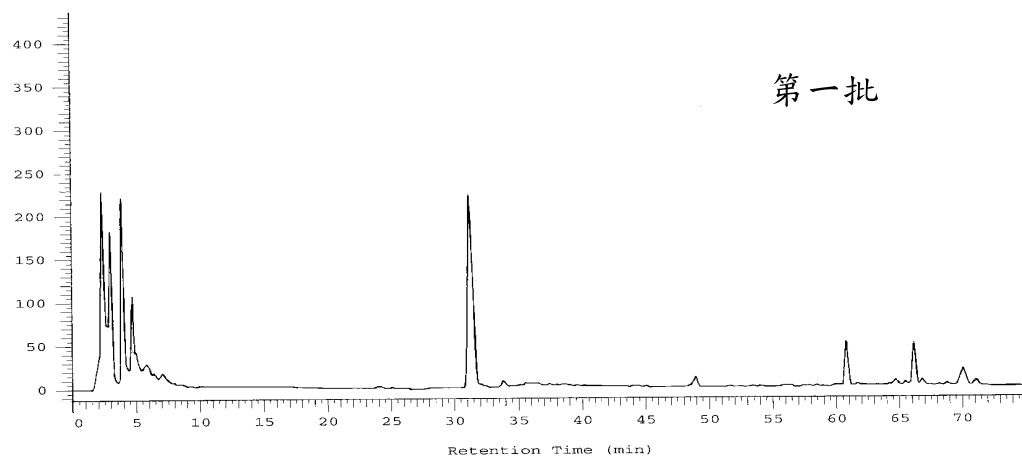


圖 47. 白朮藥材之 HPLC 層析圖

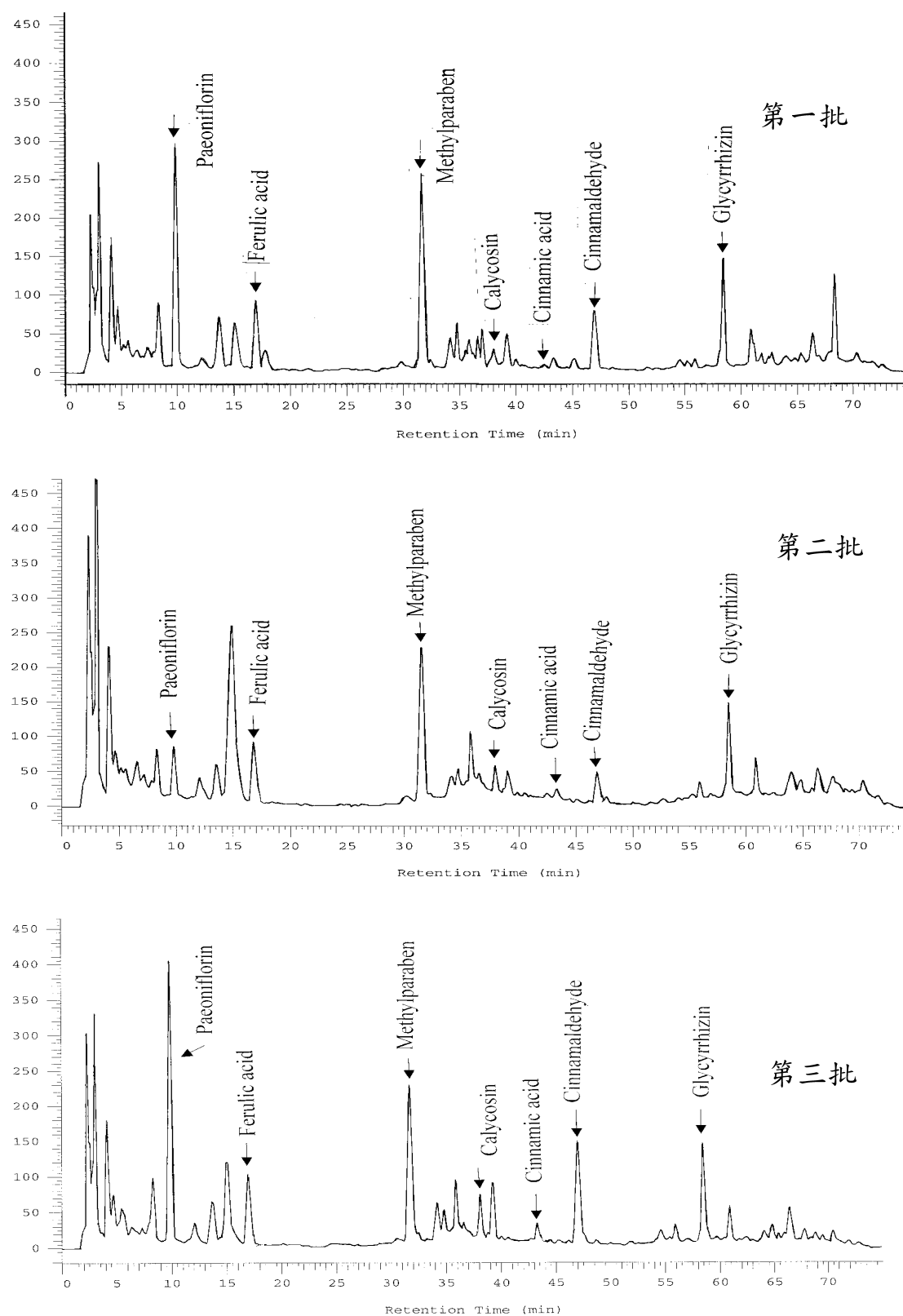


圖 48. 十全大補藥酒一個月半成品之 HPLC 層析圖

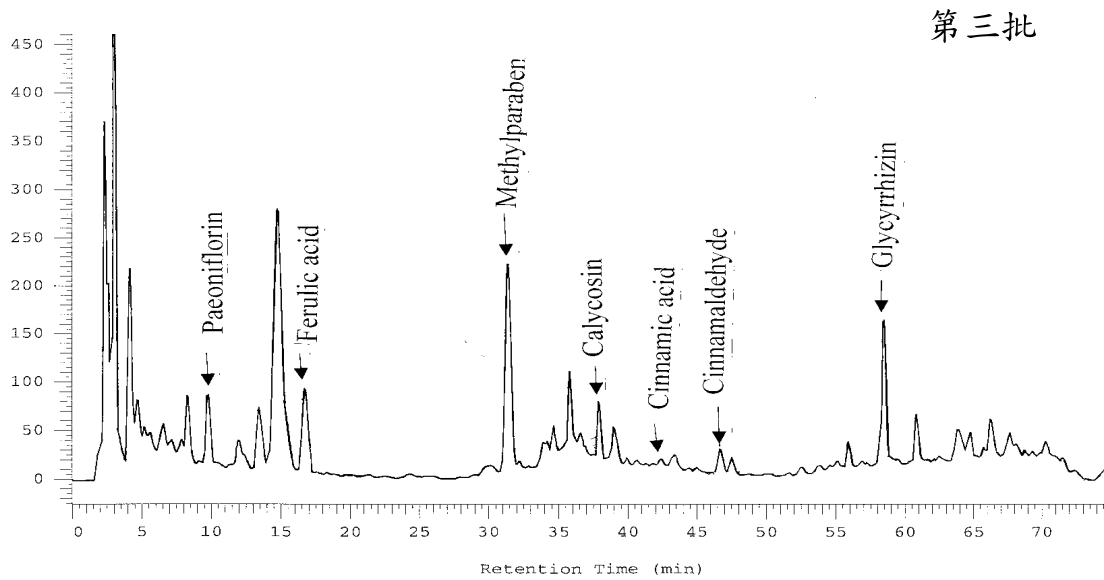
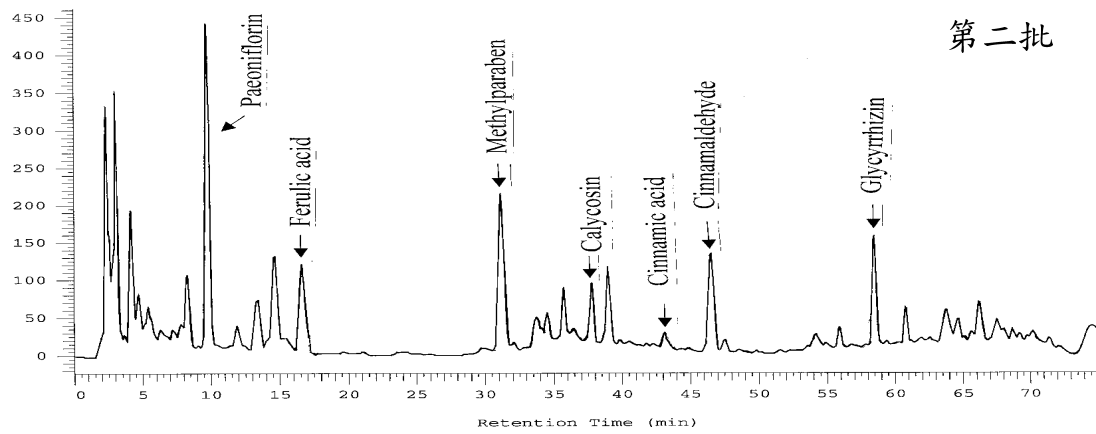
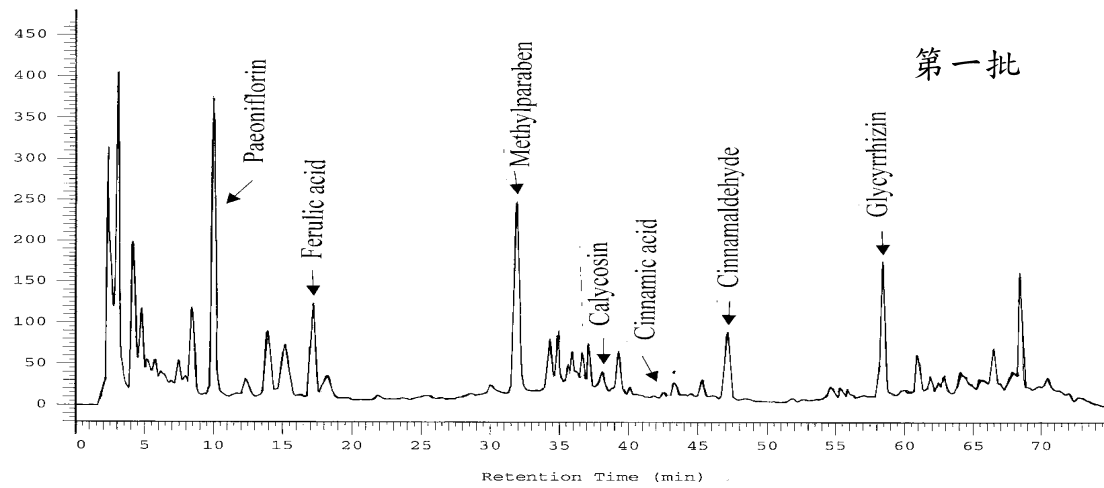


圖 49. 十全大補藥酒二個月半成品之 HPLC 層析圖

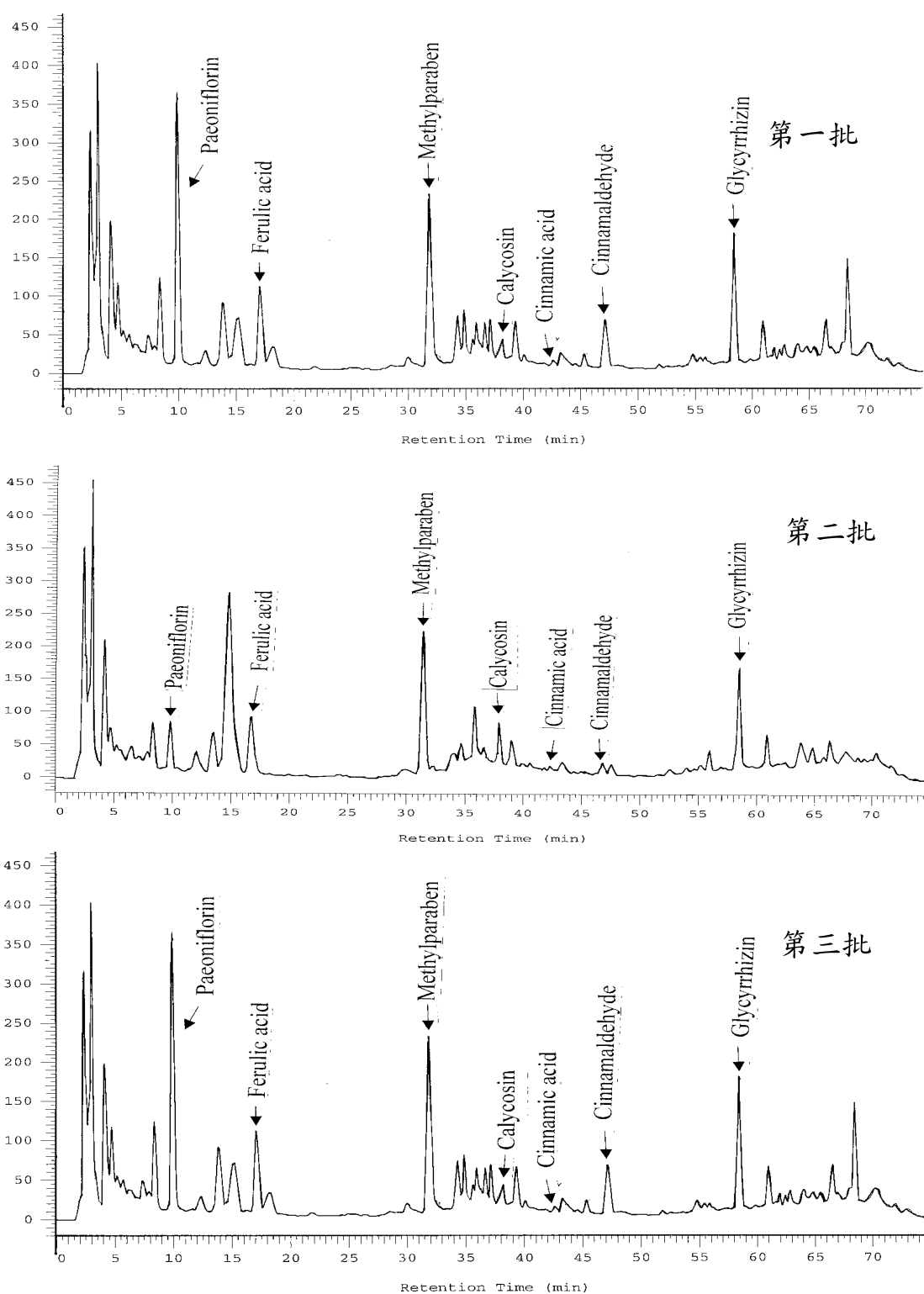


圖 50. 十全大補藥酒三個月半成品之 HPLC 層析圖

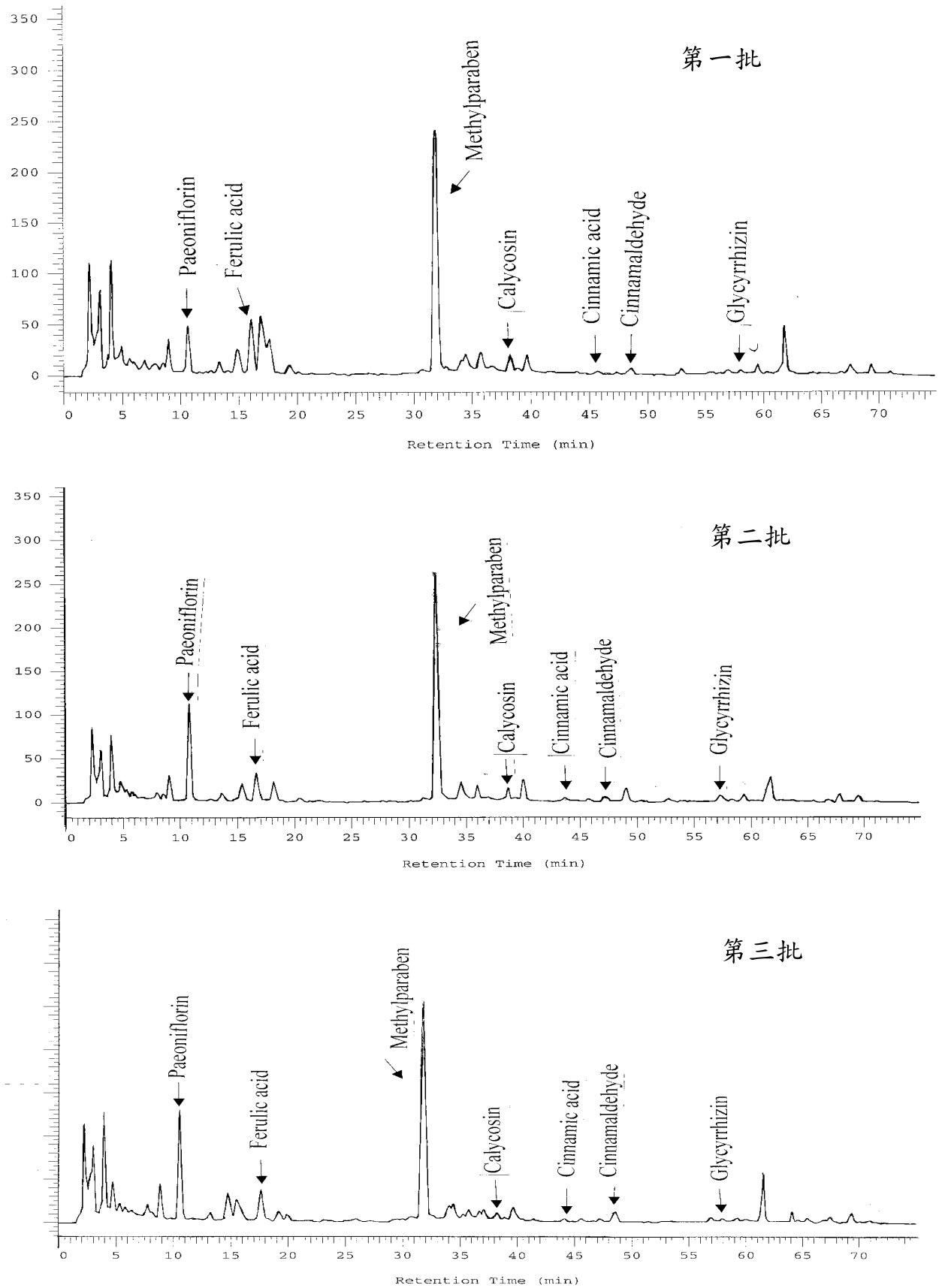


圖 51. 十全大補藥酒成品之 HPLC 層析圖

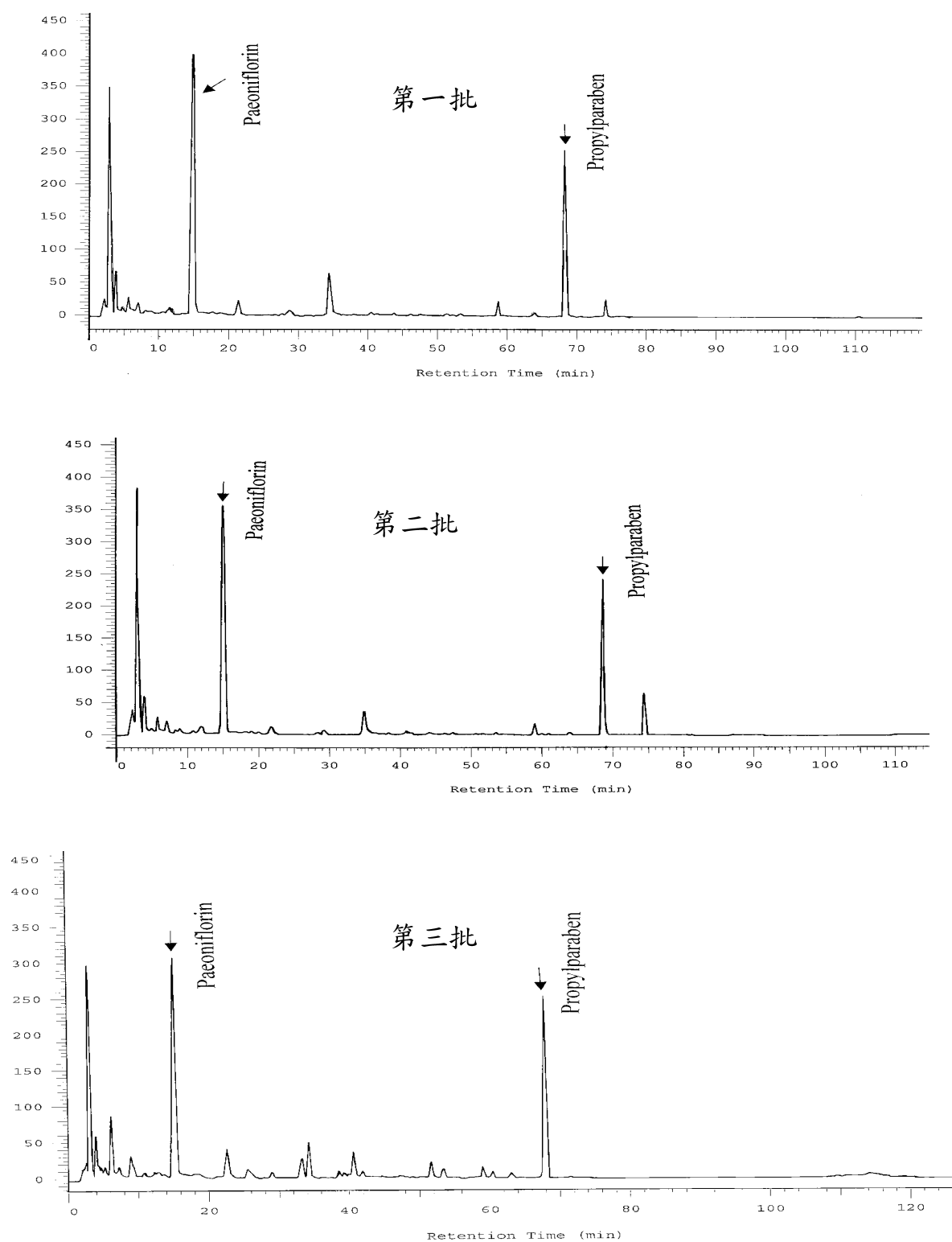


圖 52. 赤芍藥藥材之 HPLC 層析圖

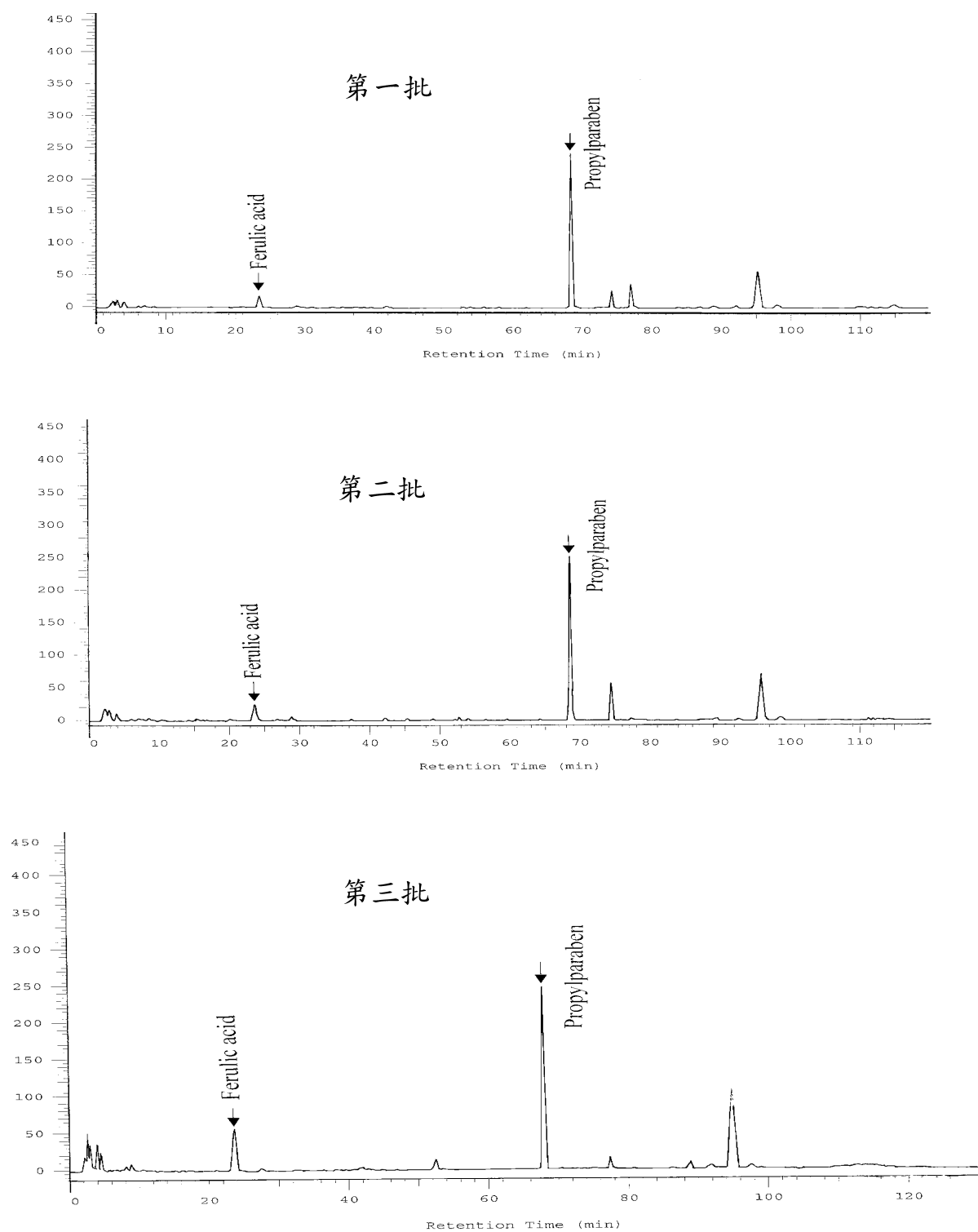


圖 53. 當歸藥材之 HPLC 層析圖

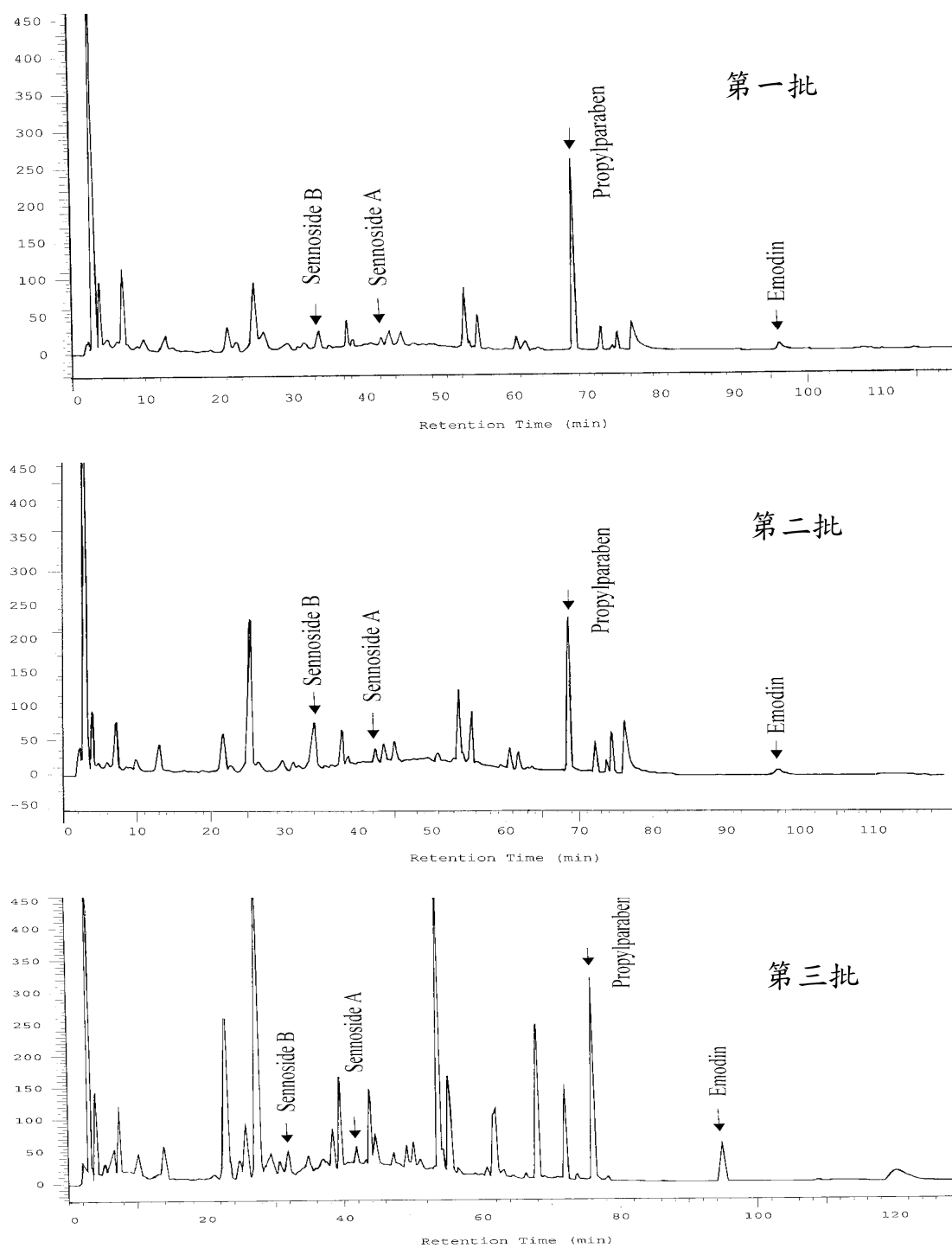


圖 54. 大黃藥材之 HPLC 層析圖

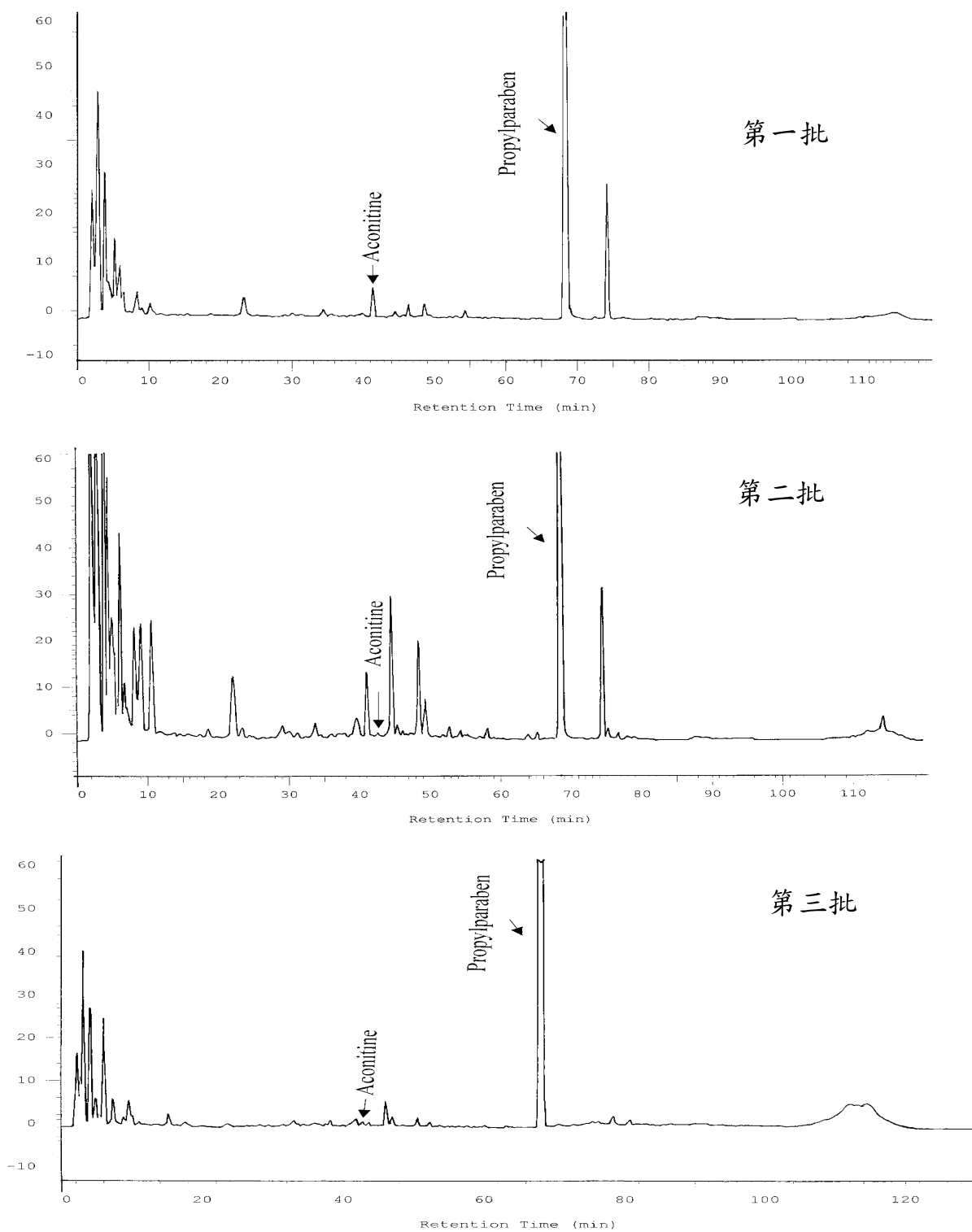


圖 55. 川烏藥材之 HPLC 層析圖

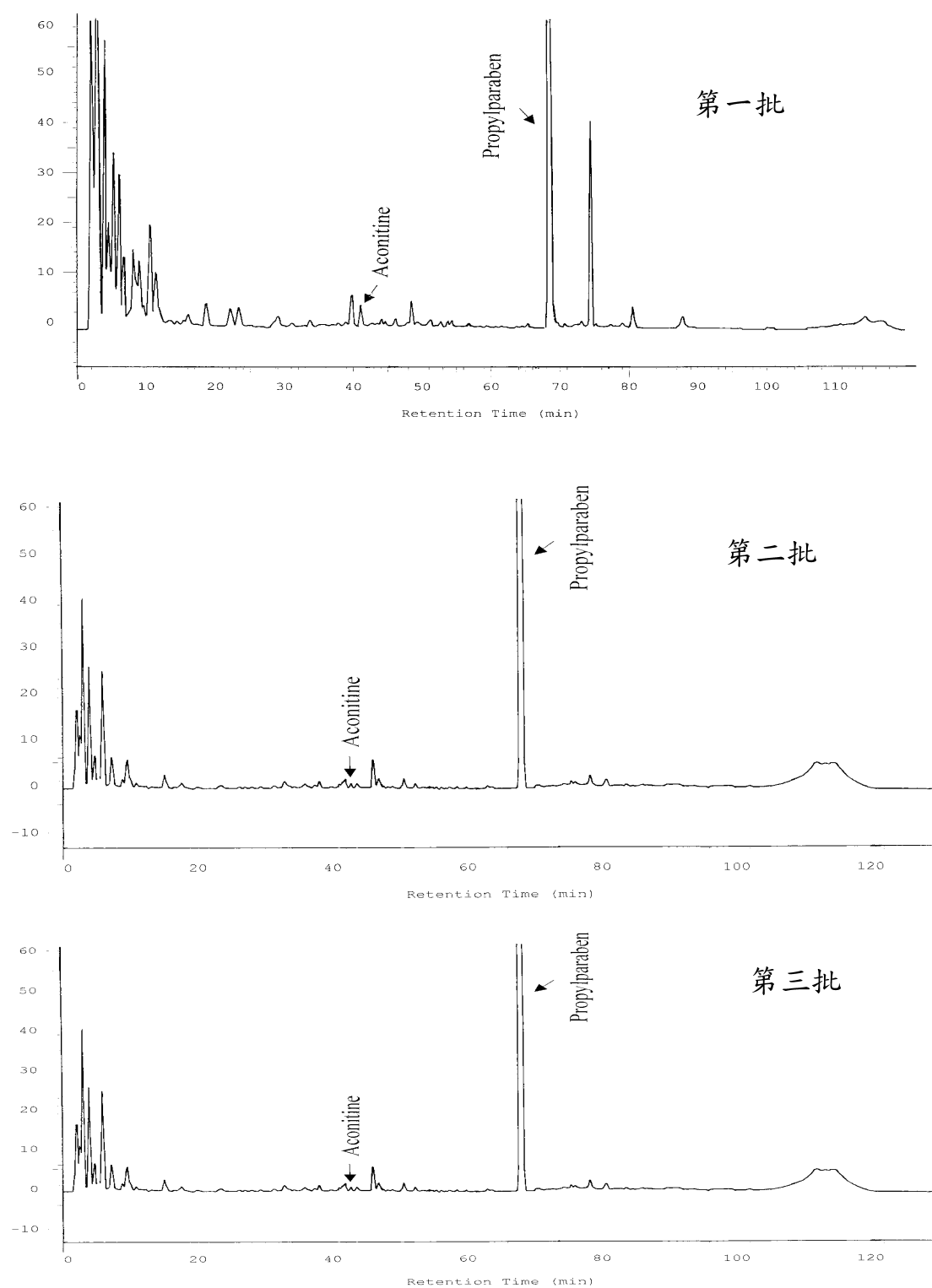


圖 56. 草烏藥材之 HPLC 層析圖

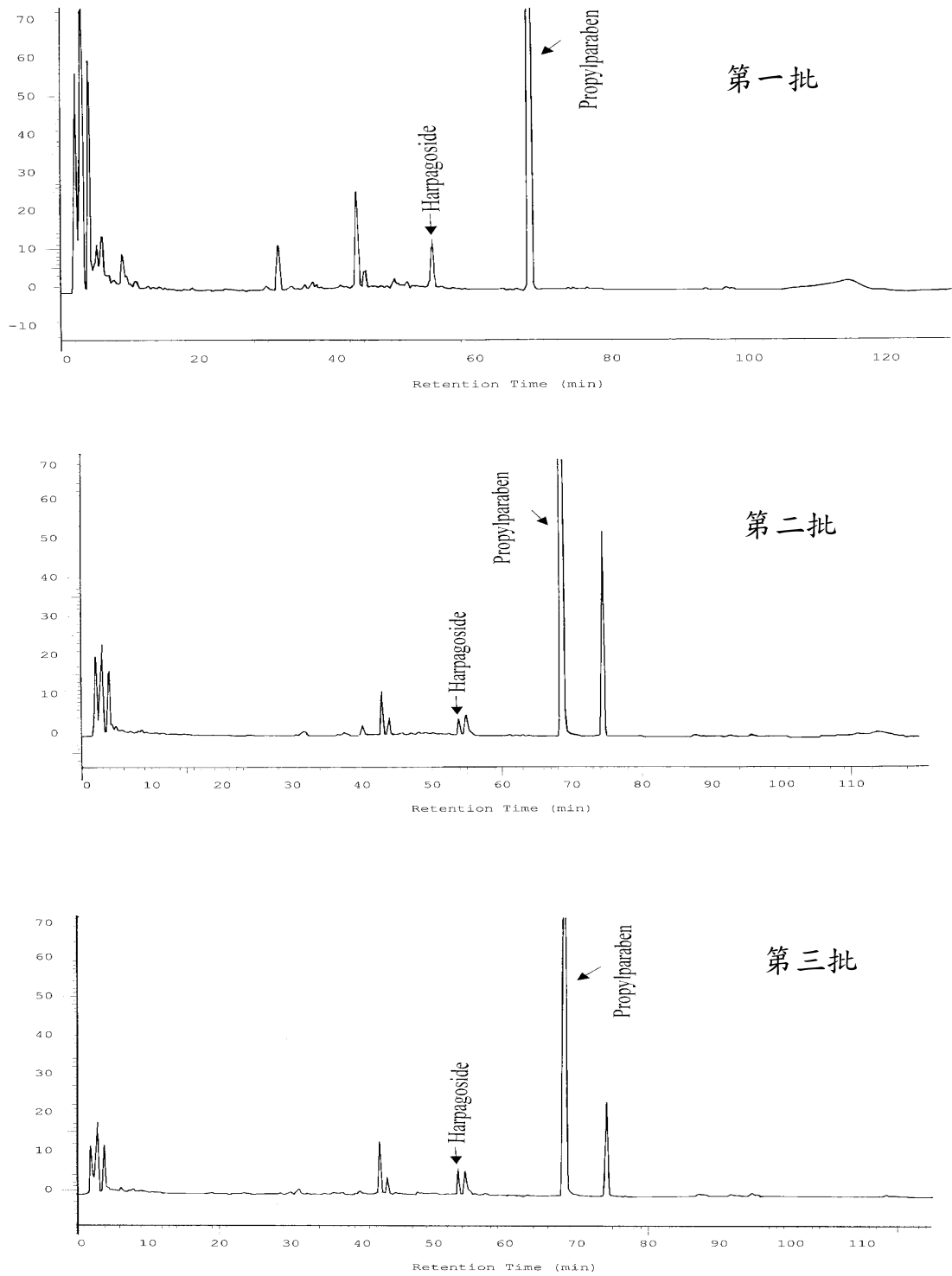


圖 57. 元蓼藥材之 HPLC 層析圖

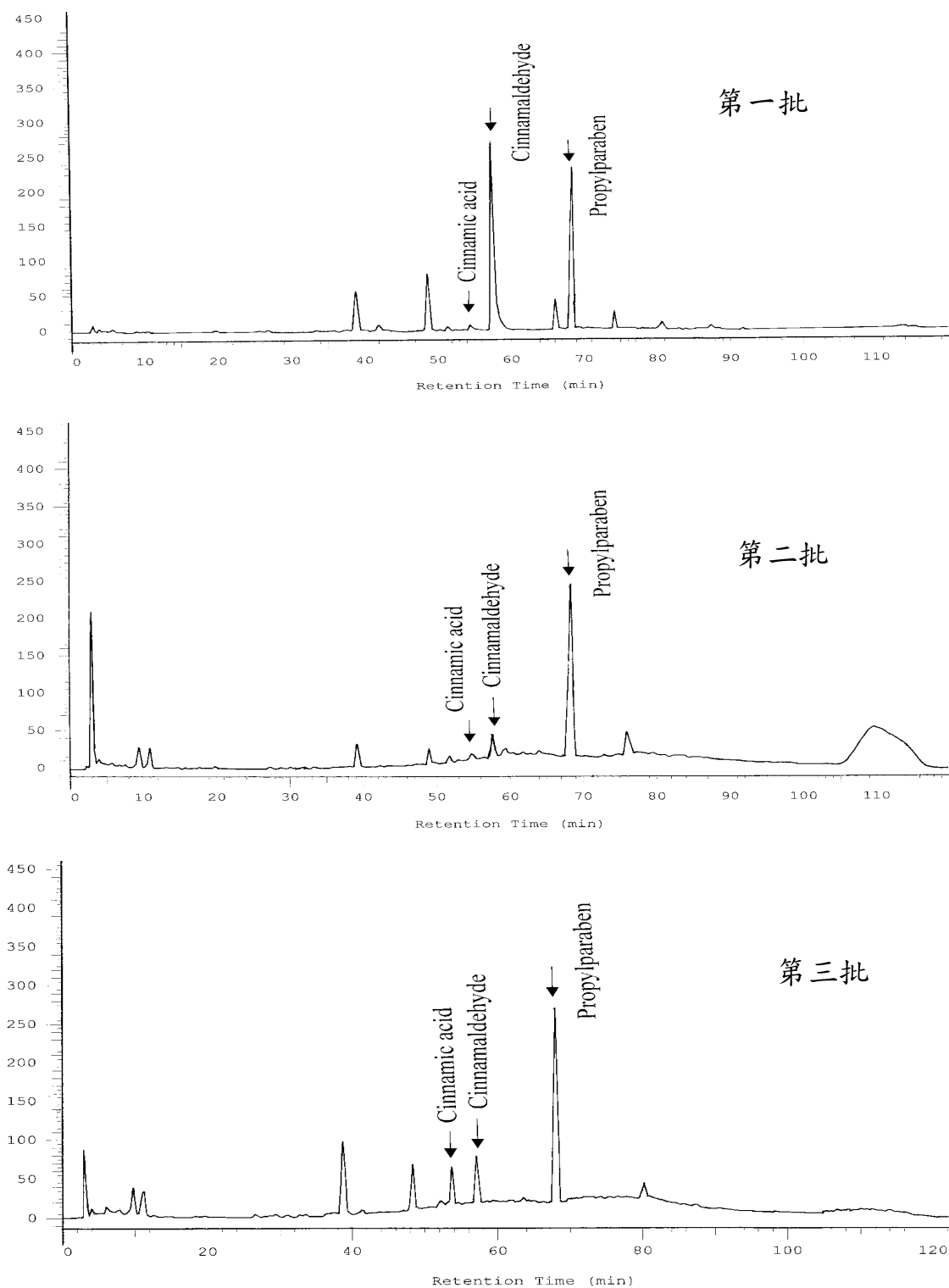


圖 58. 肉桂藥材之 HPLC 層析圖

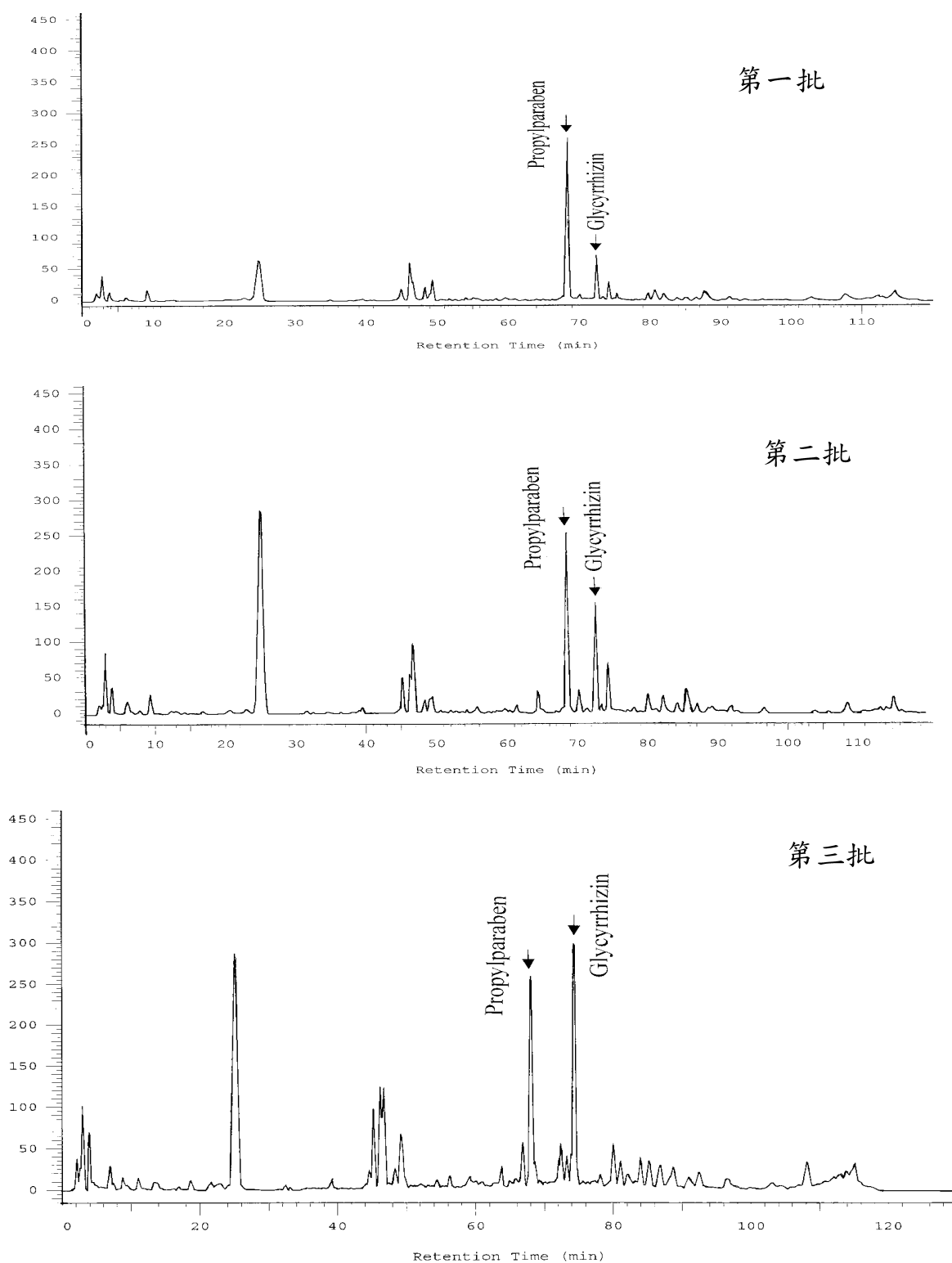


圖 59. 甘草藥材之 HPLC 層析圖

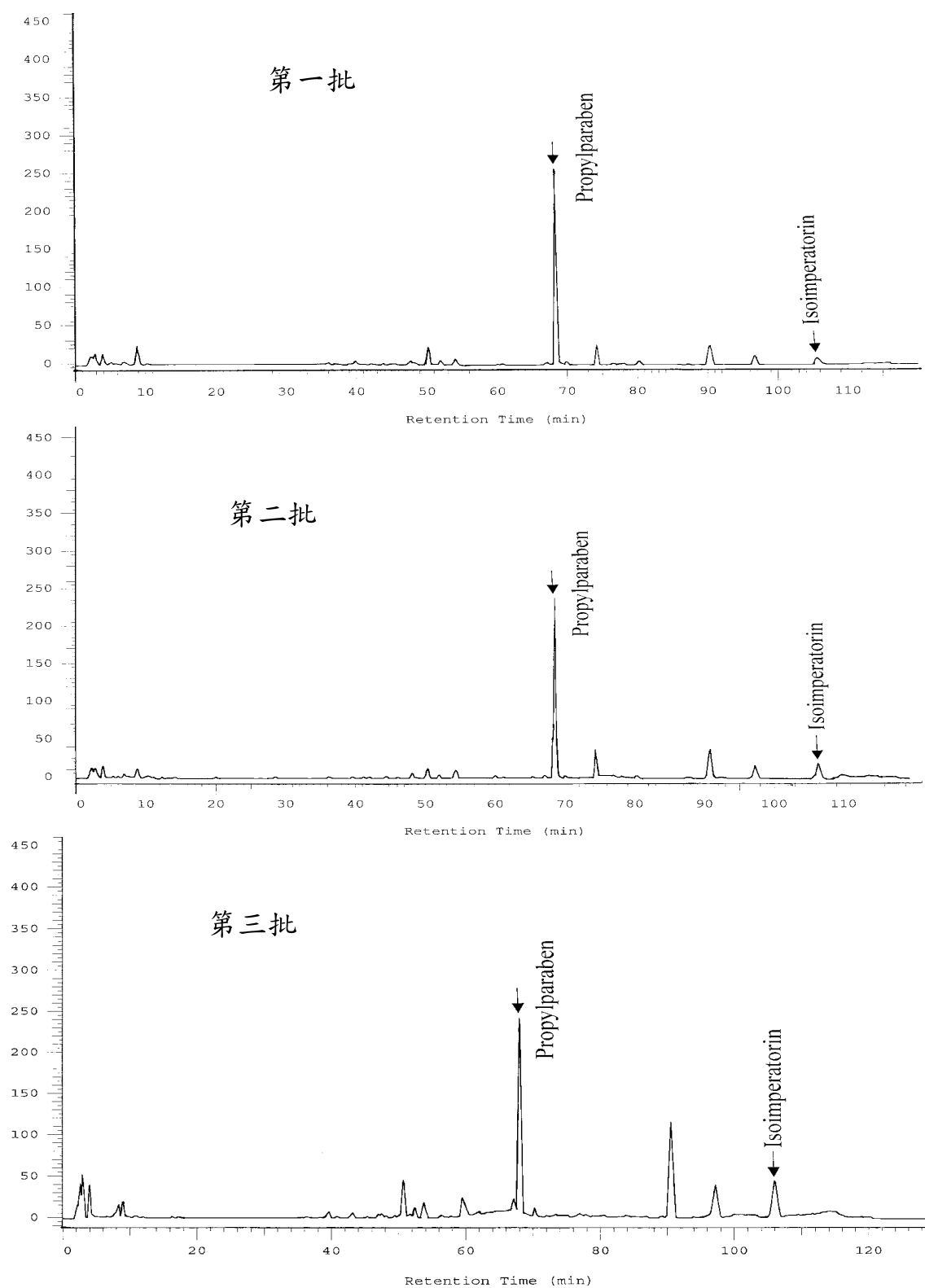


圖 60. 白芷藥材之 HPLC 層析圖

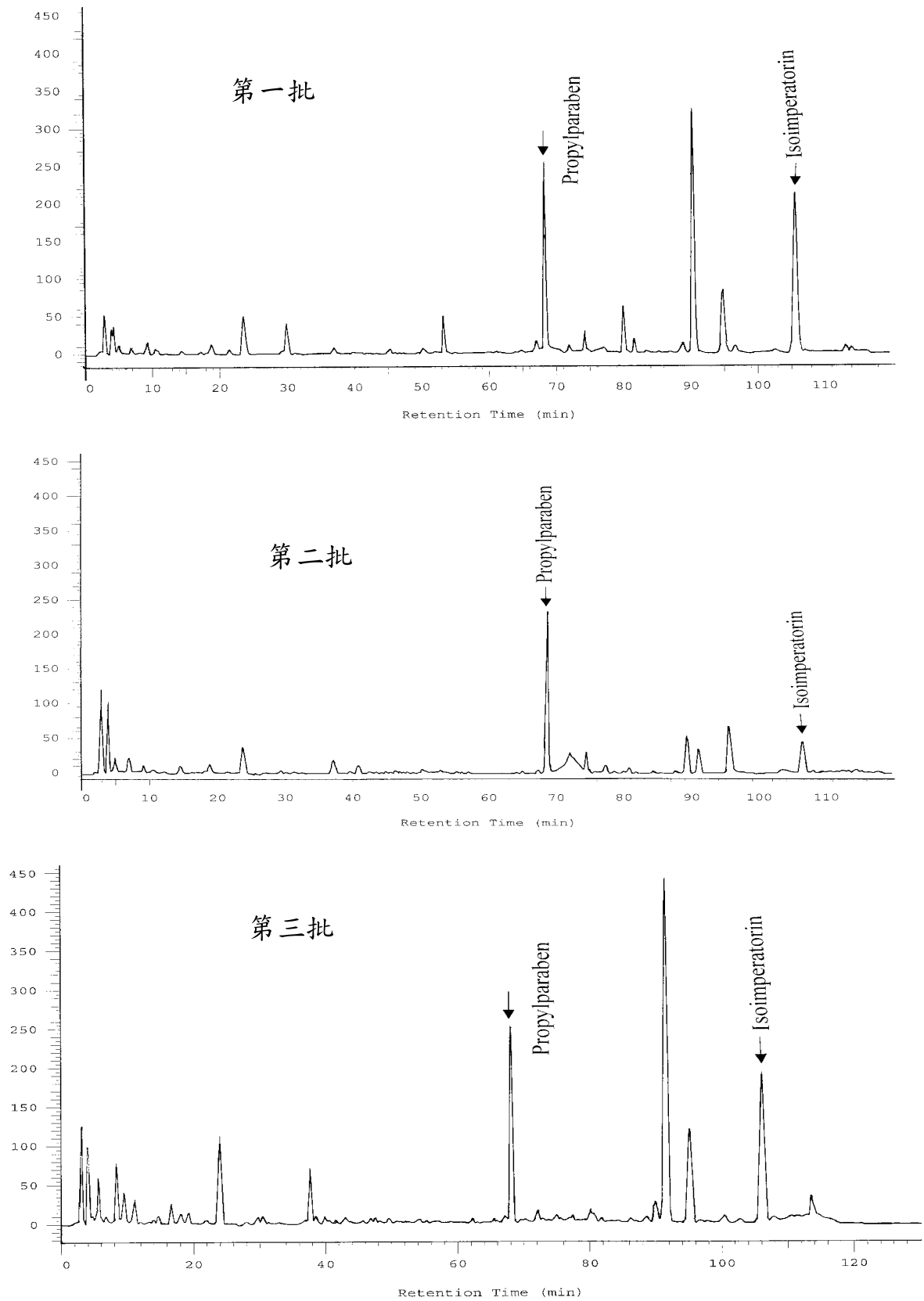


圖 61. 羌活藥材之 HPLC 層析圖

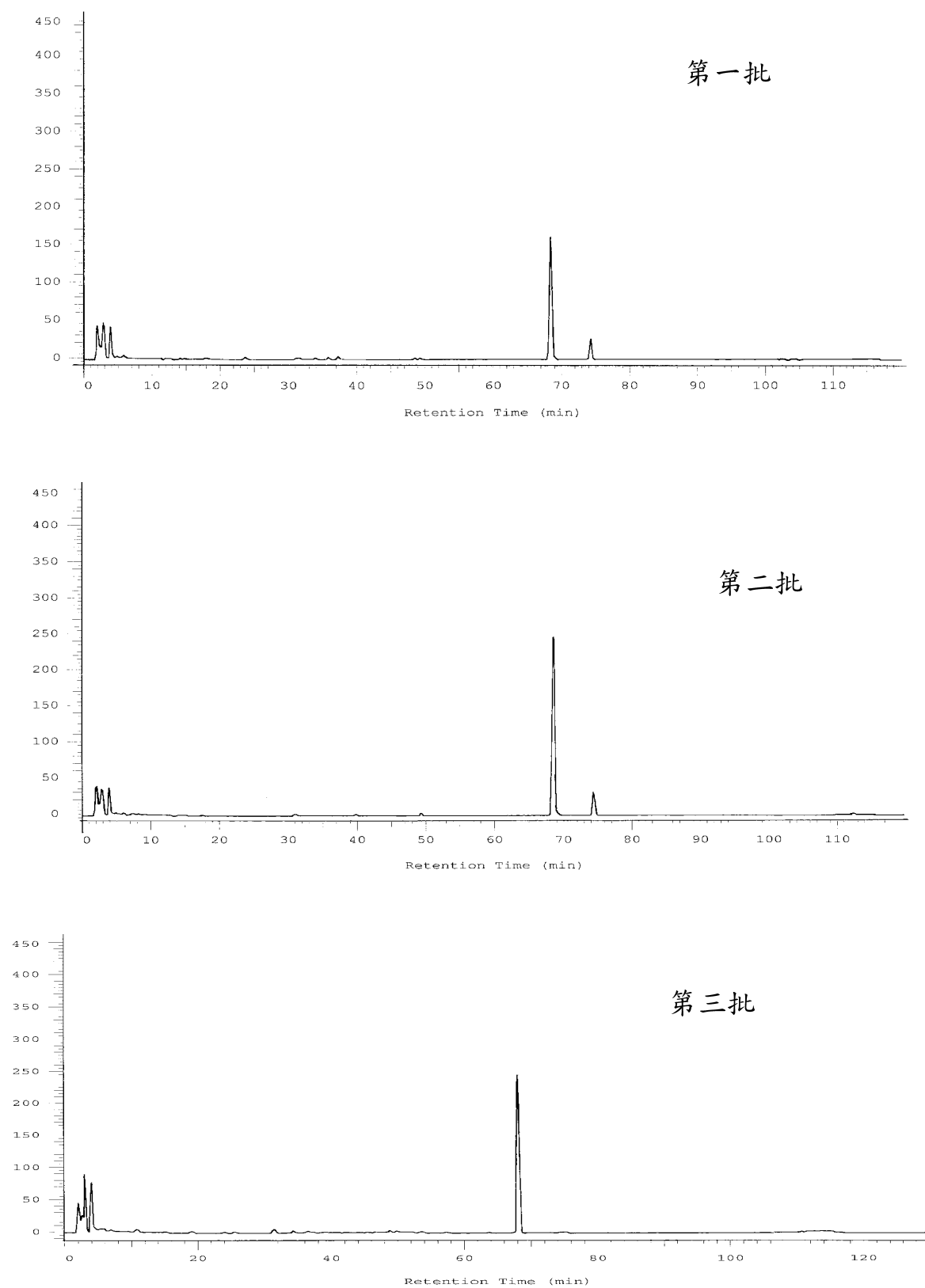


圖 62. 生地黄藥材之 HPLC 層析圖

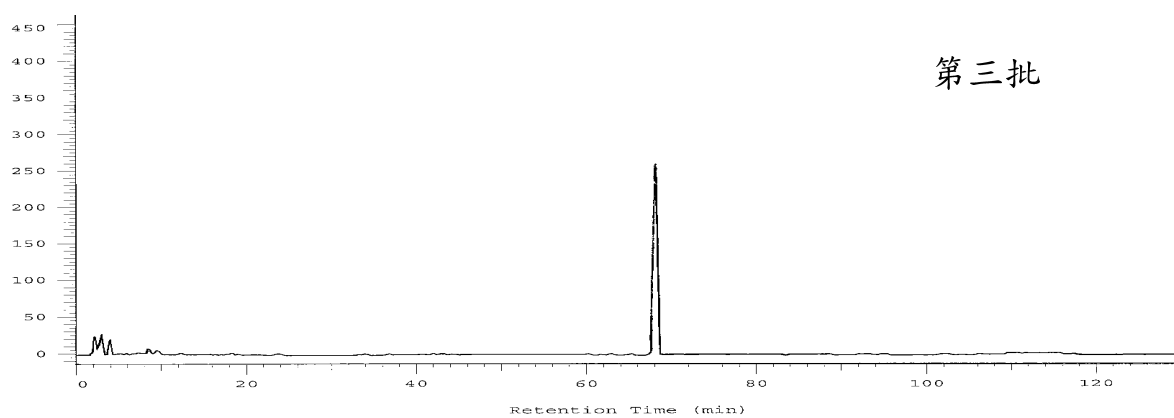
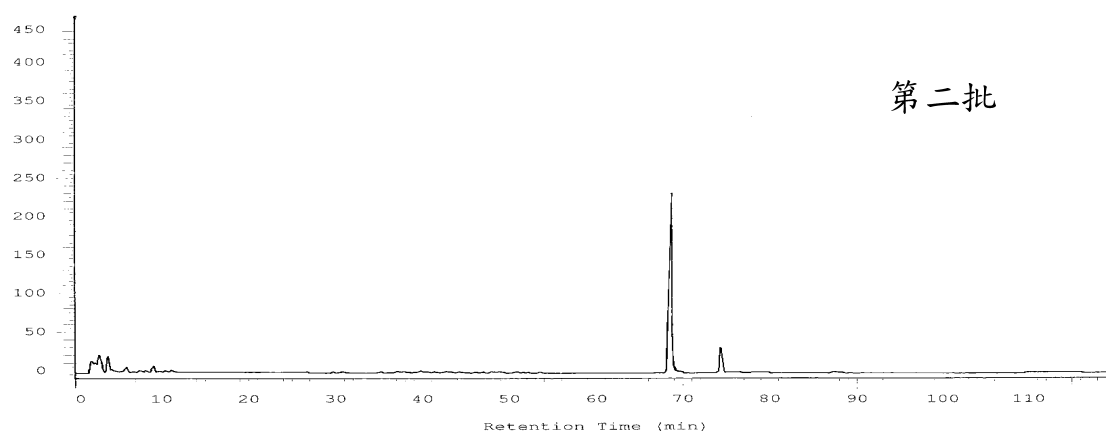
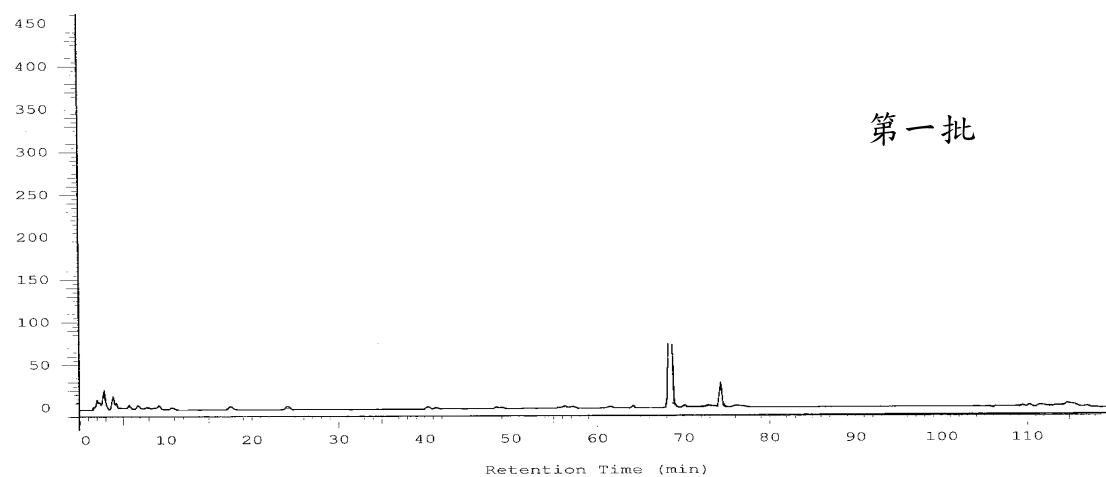


圖 63. 白薤藥材之 HPLC 層析圖

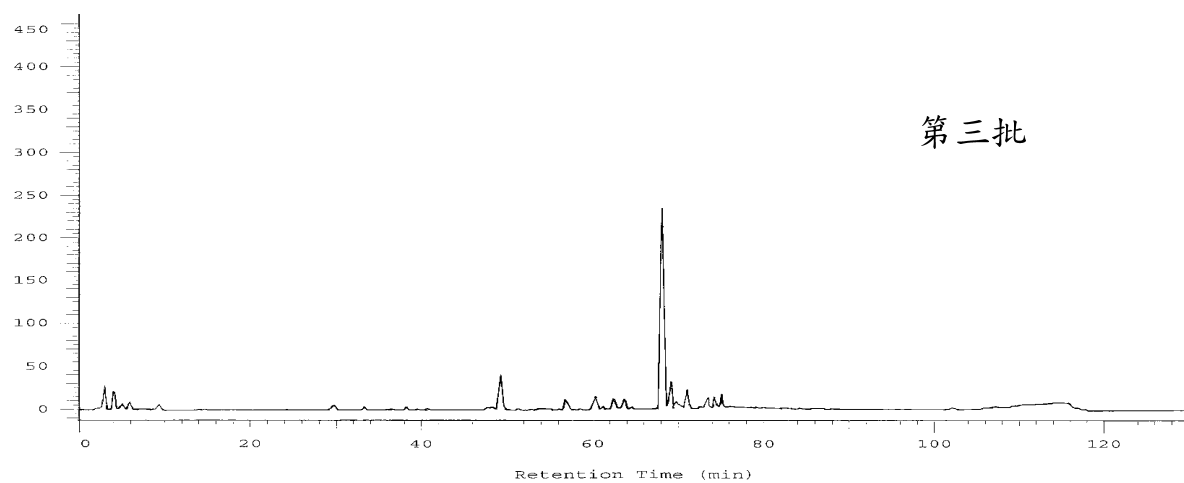
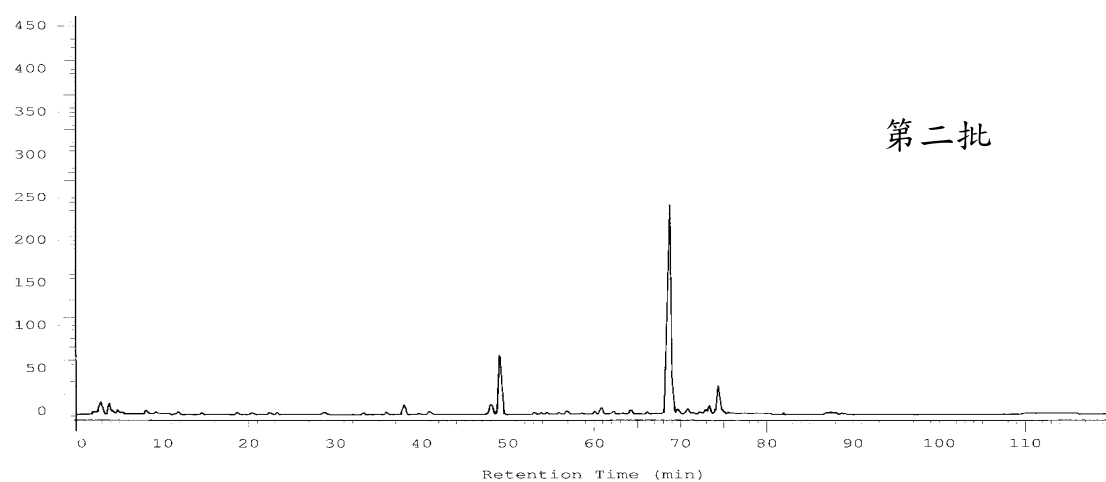
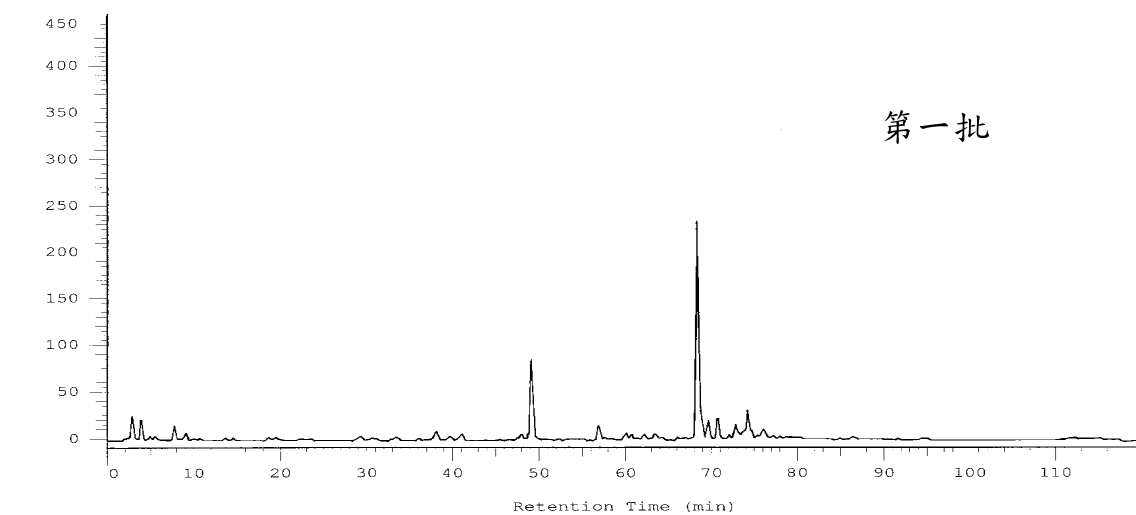


圖 64. 白芨藥材之 HPLC 層析圖

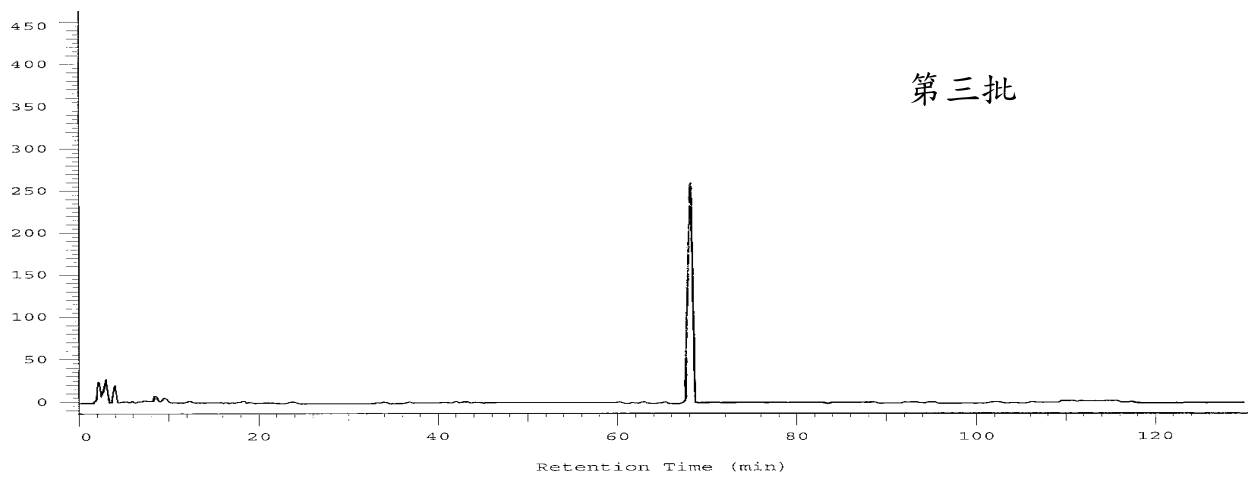
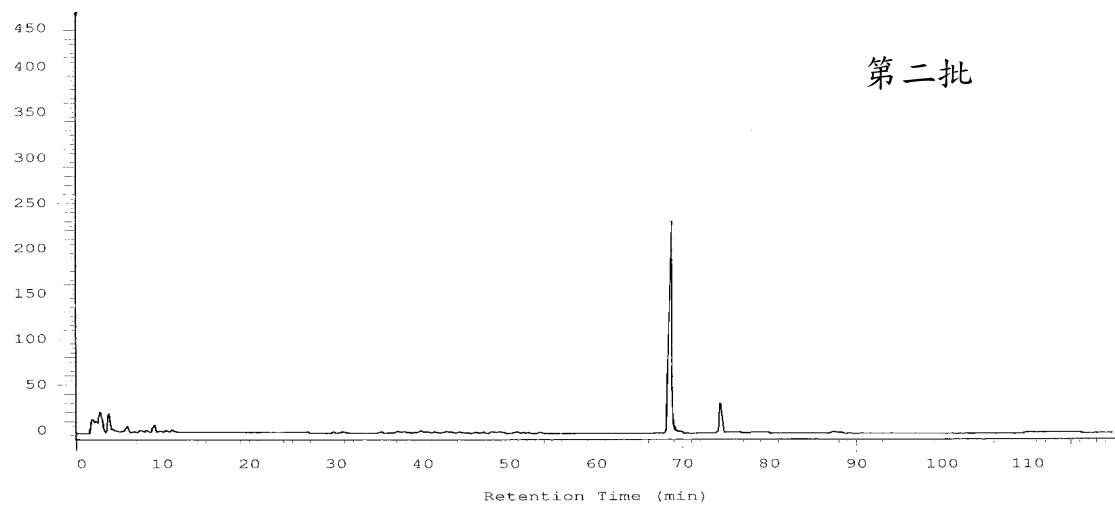
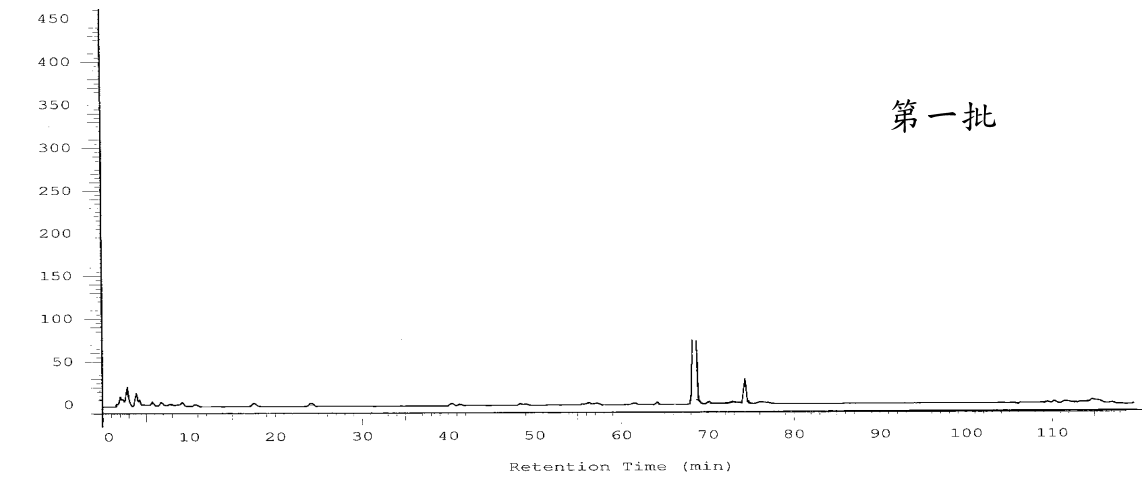


圖 65. 苦蔘藥材之 HPLC 層析圖

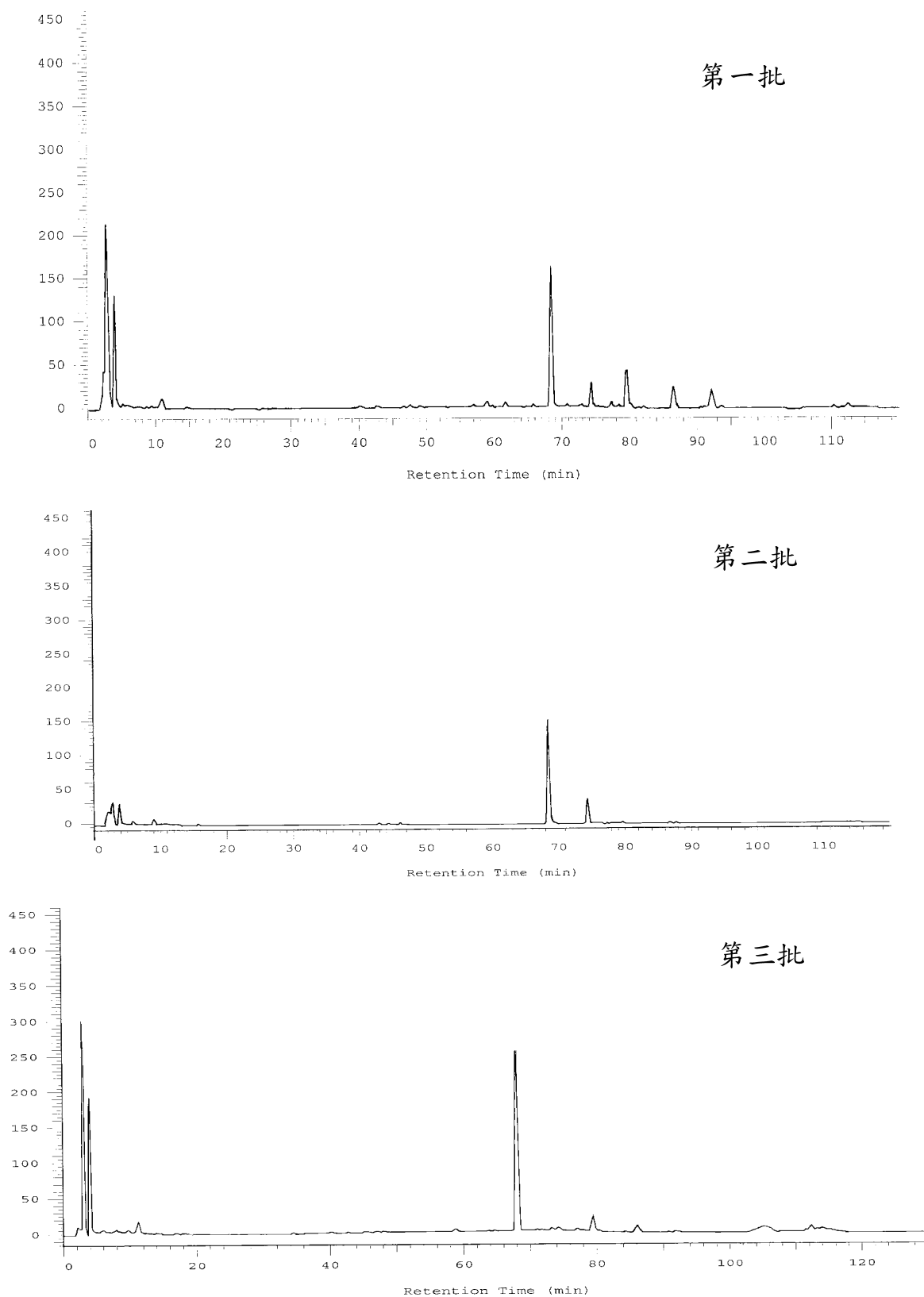


圖 66. 烏藥藥材之 HPLC 層析圖

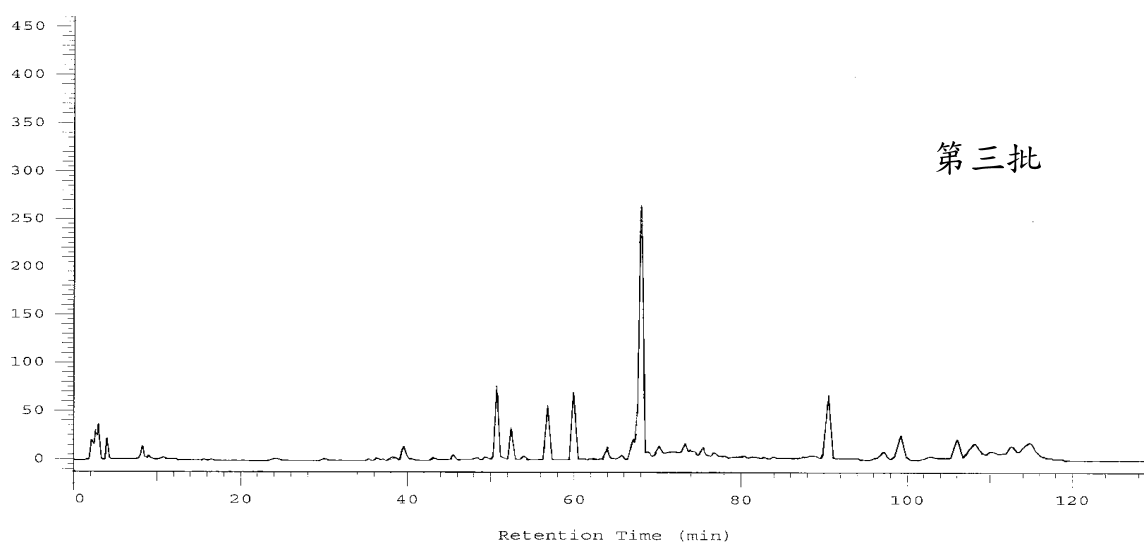
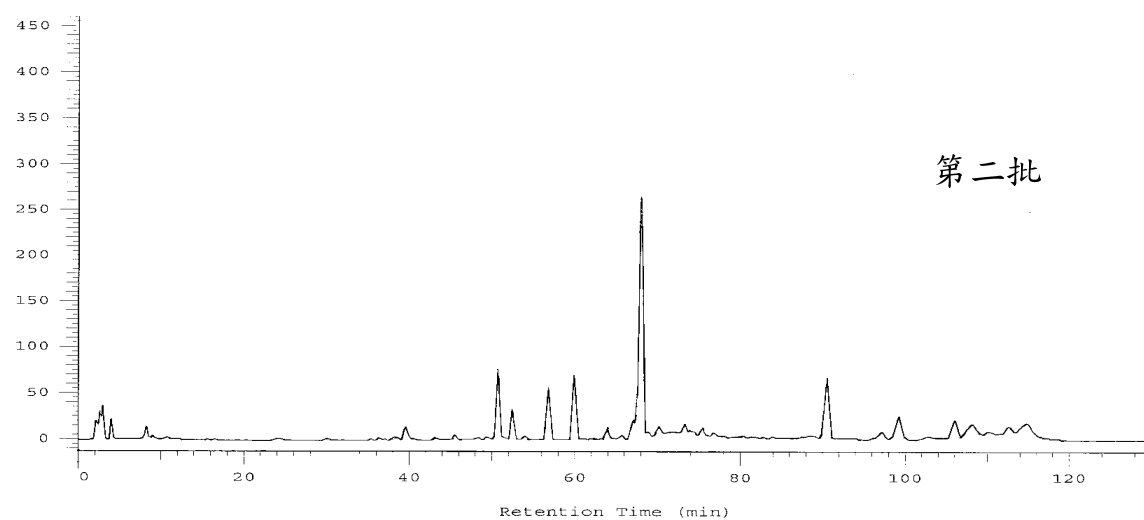
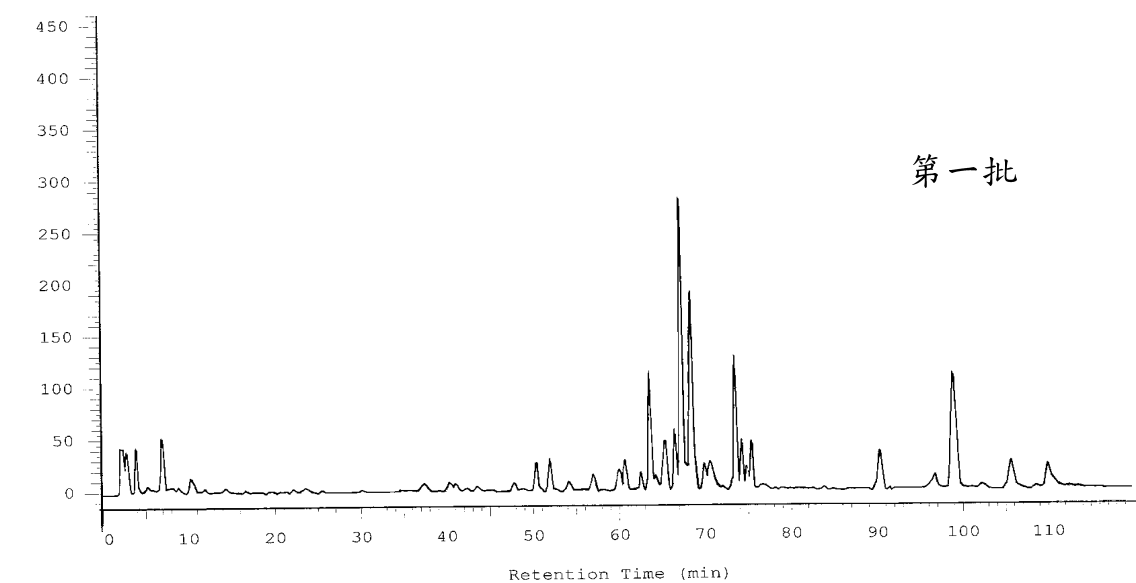


圖 67. 獨活藥材之 HPLC 層析圖

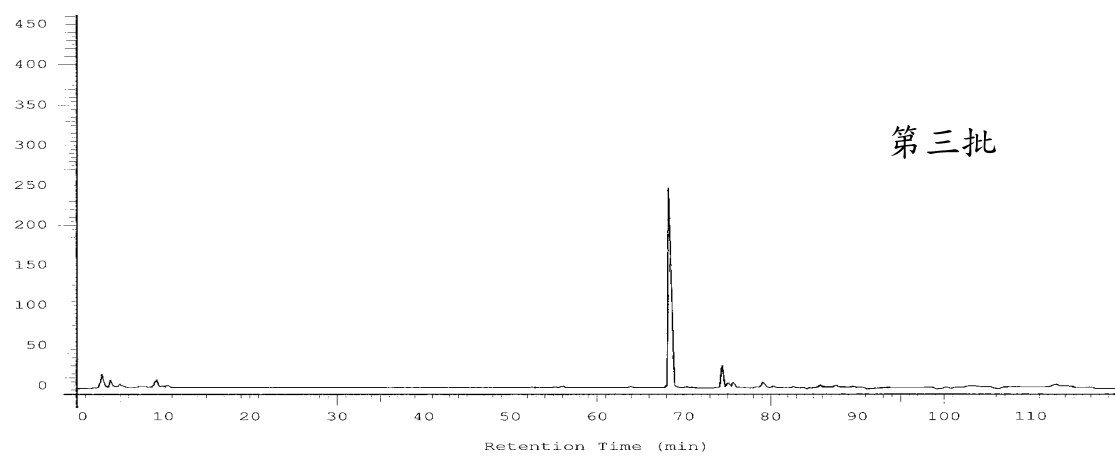
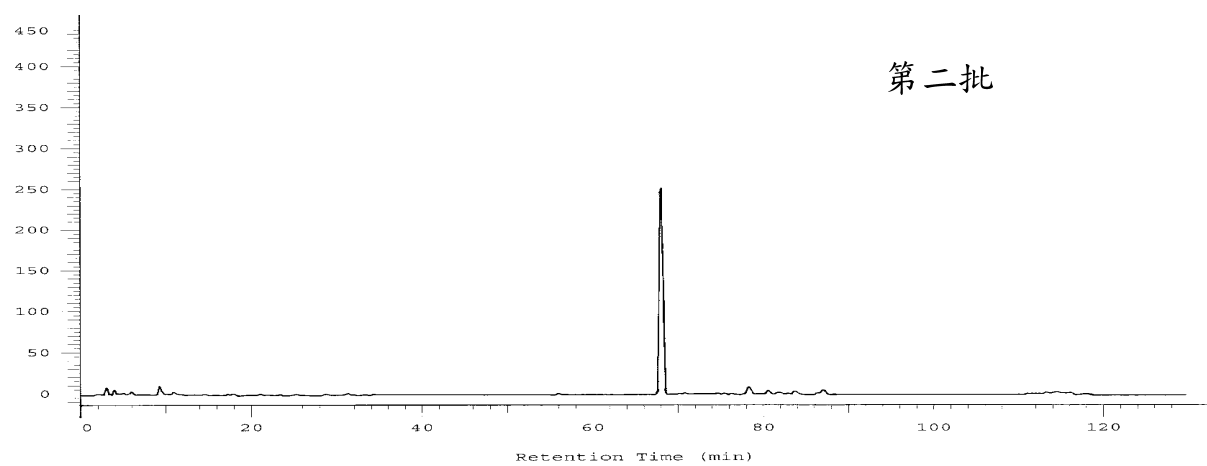
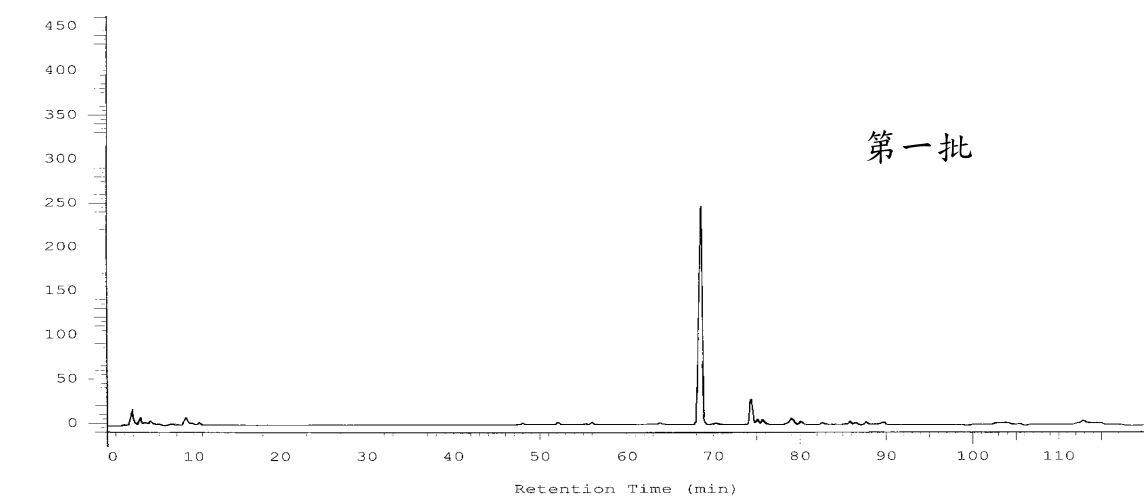


圖 68. 木鯨子藥材之 HPLC 層析圖

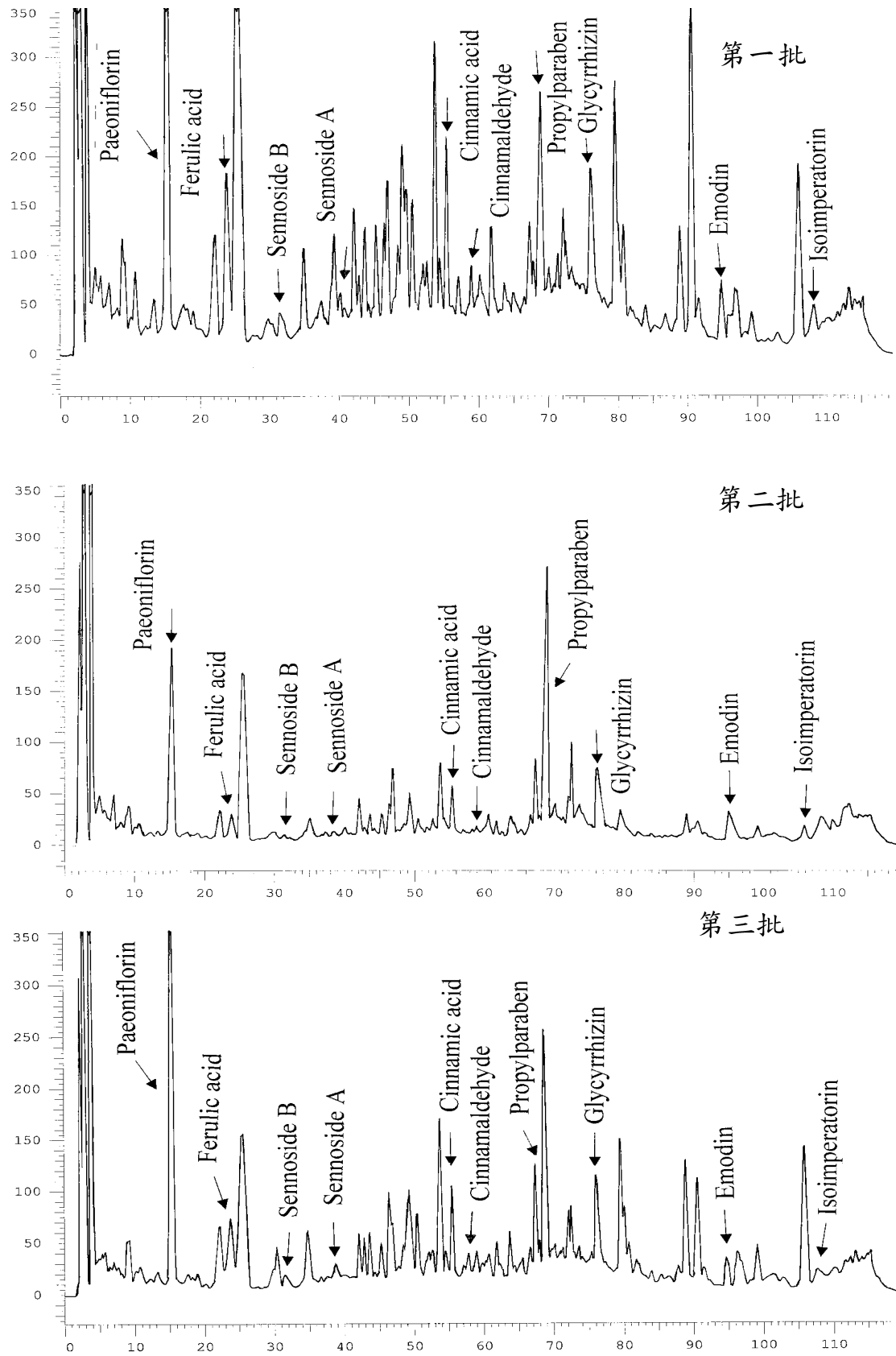


圖 69. 萬應膏油性貼布半成品之 HPLC 層析圖

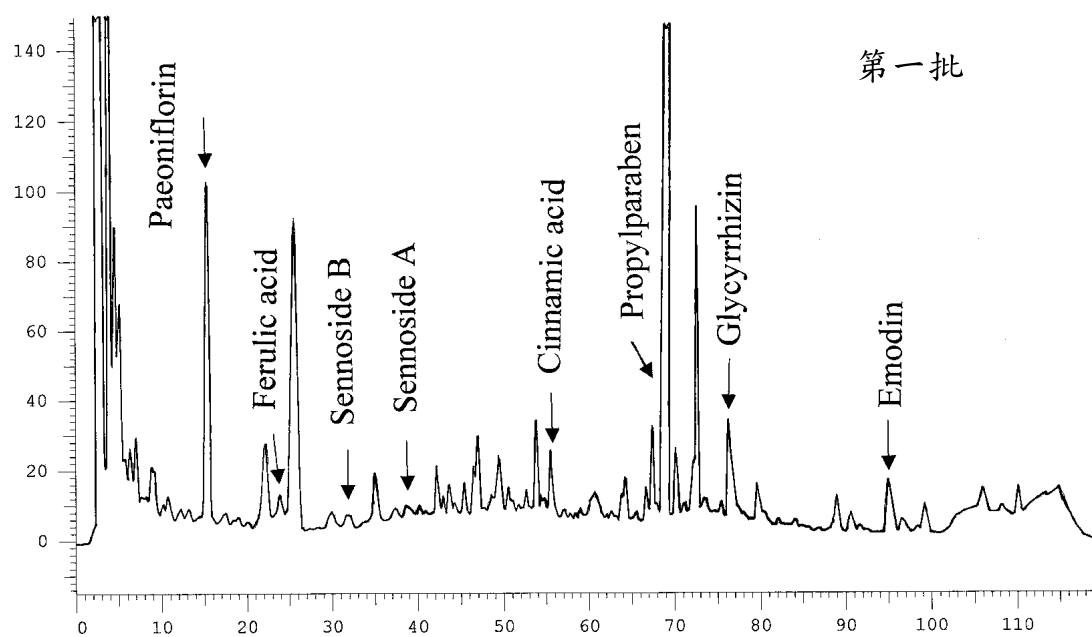


圖 70. 萬應膏水性貼布半成品之 HPLC 層析圖

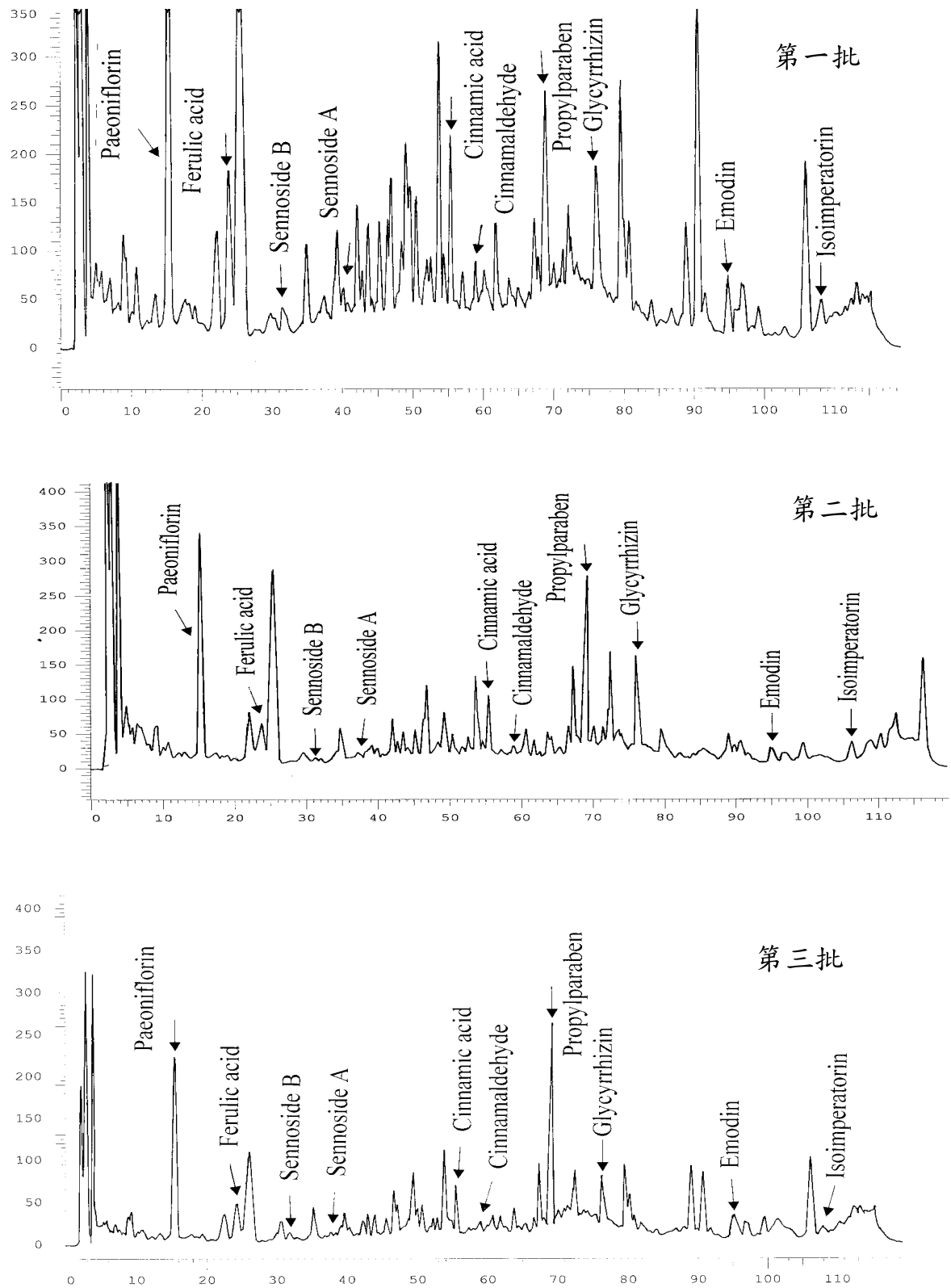


圖 71. 萬應膏油性貼布成品之 HPLC 層析圖

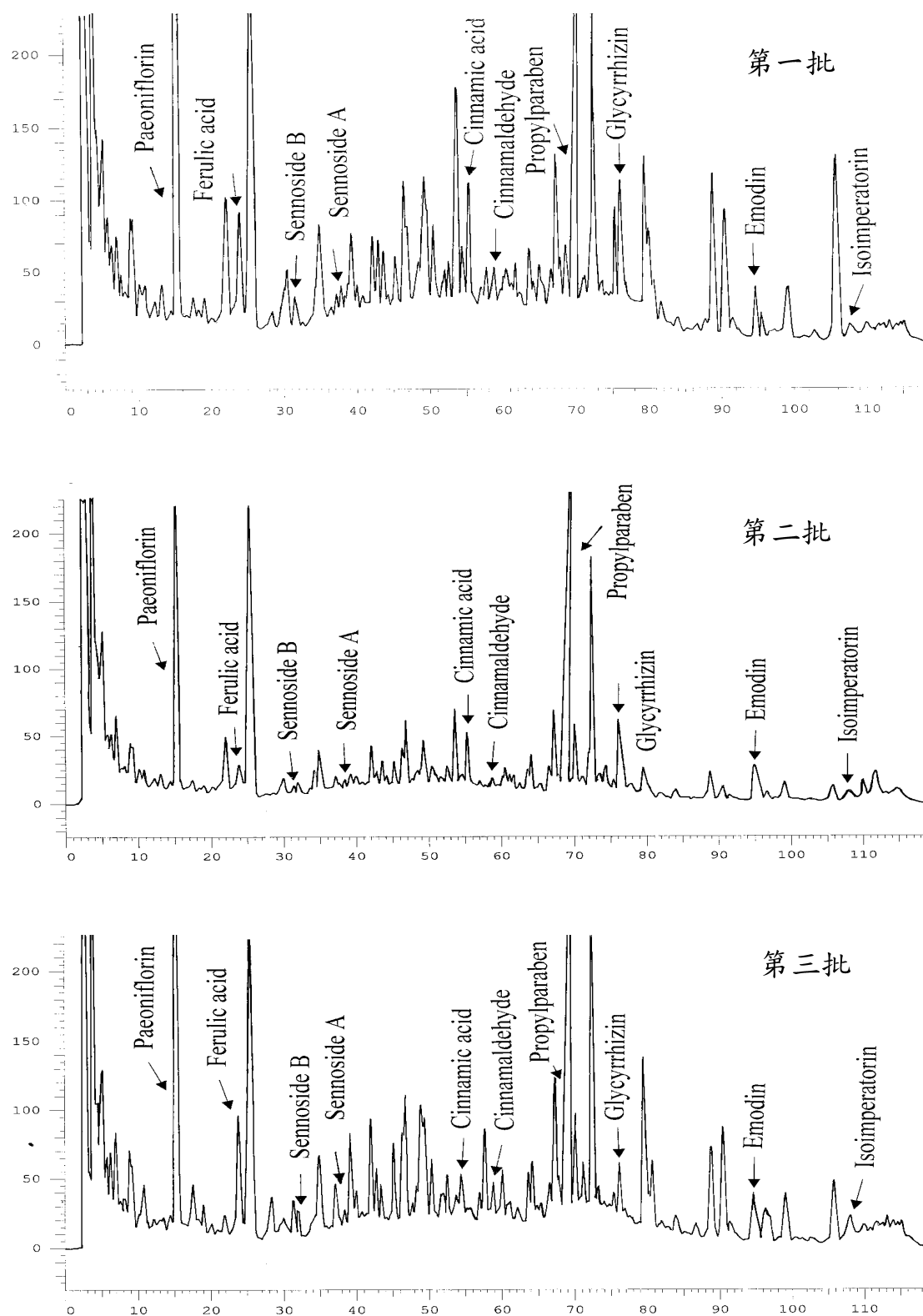


圖 72. 萬應膏水性貼布成品之 HPLC 層析圖

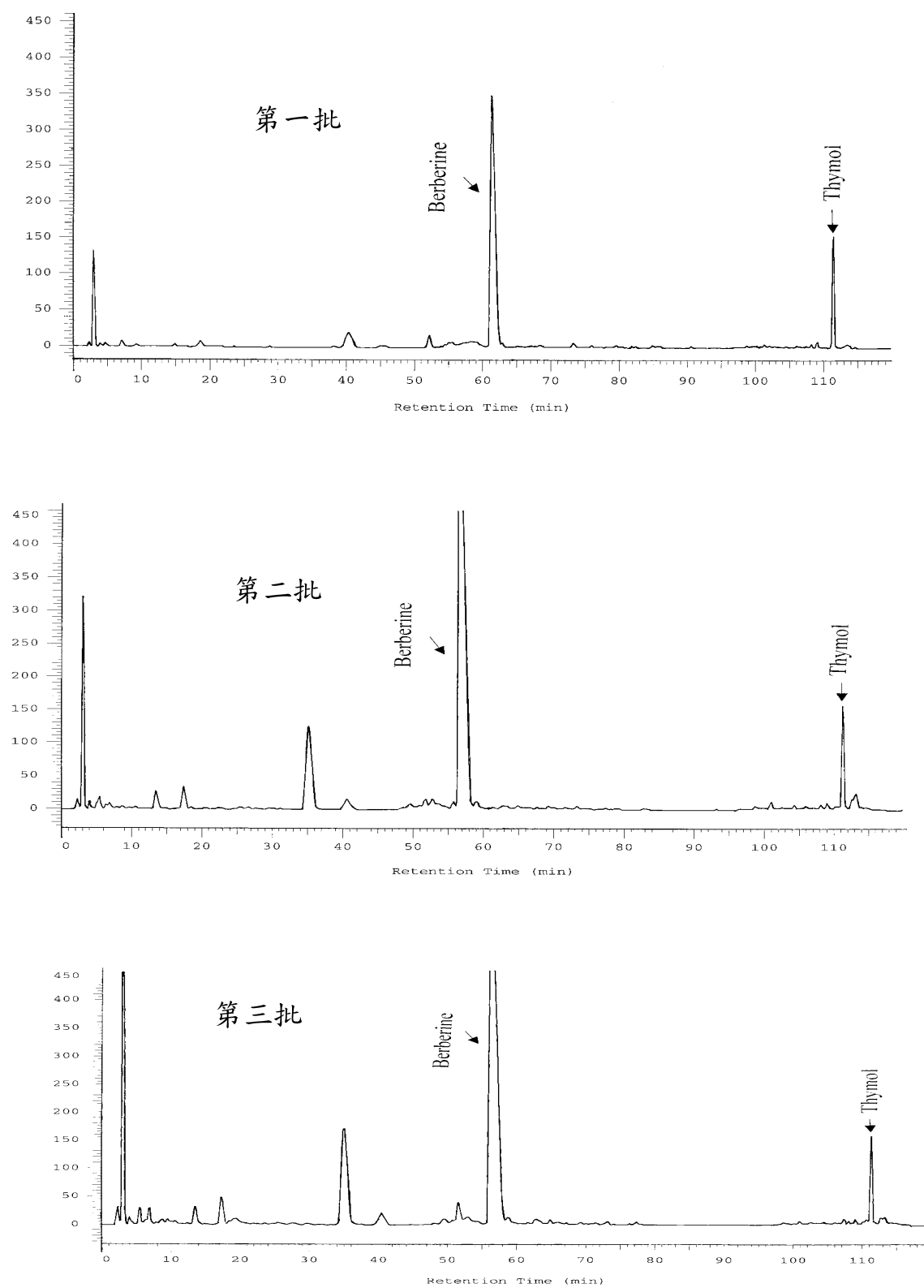


圖 73. 黃柏藥材之 HPLC 層析圖

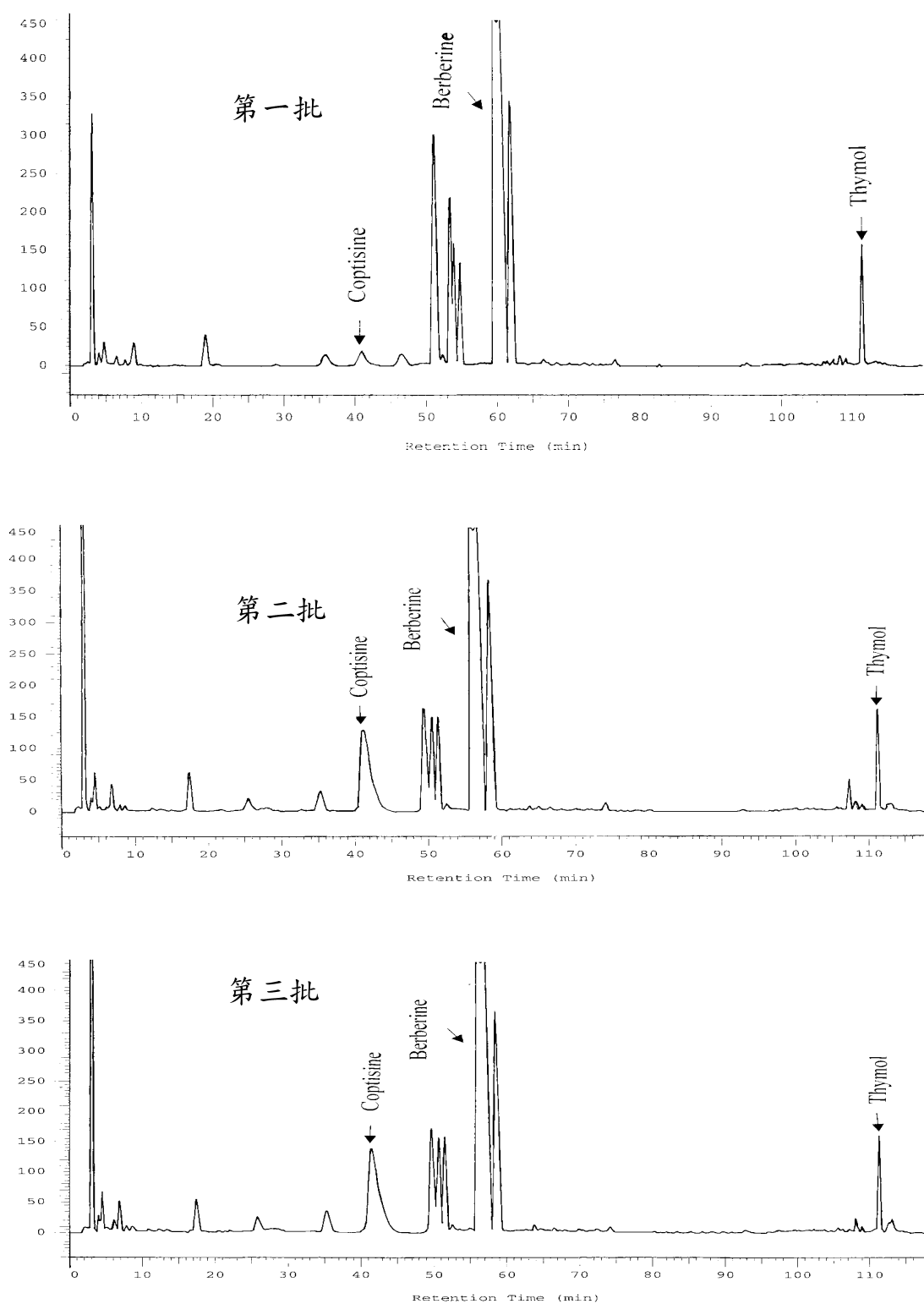


圖 74. 黃連藥材之 HPLC 層析圖

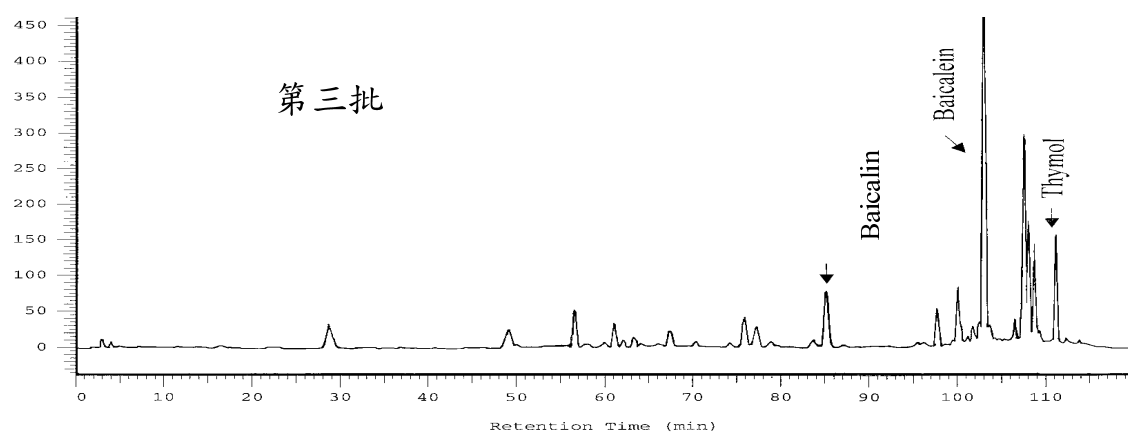
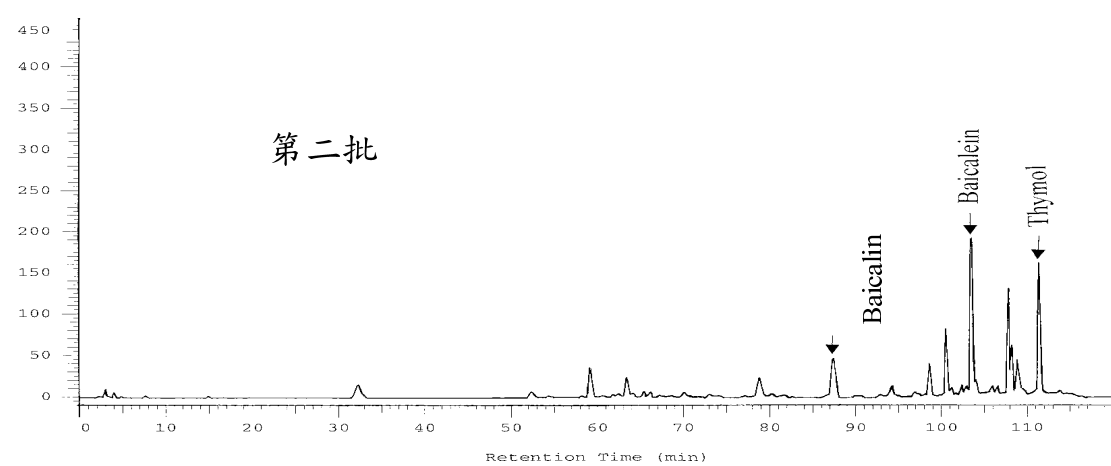
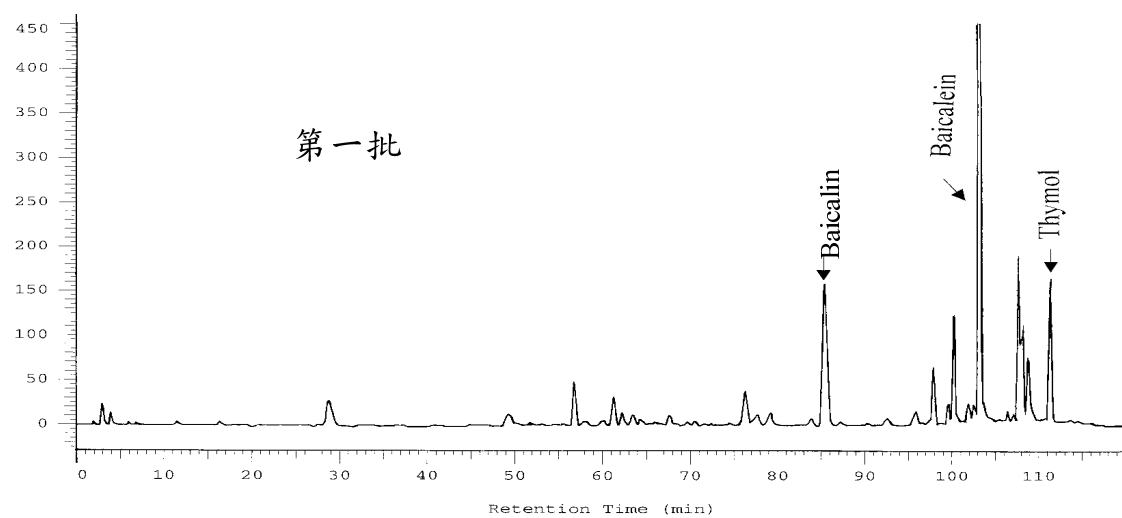


圖 75. 黃芩藥材之 HPLC 層析圖

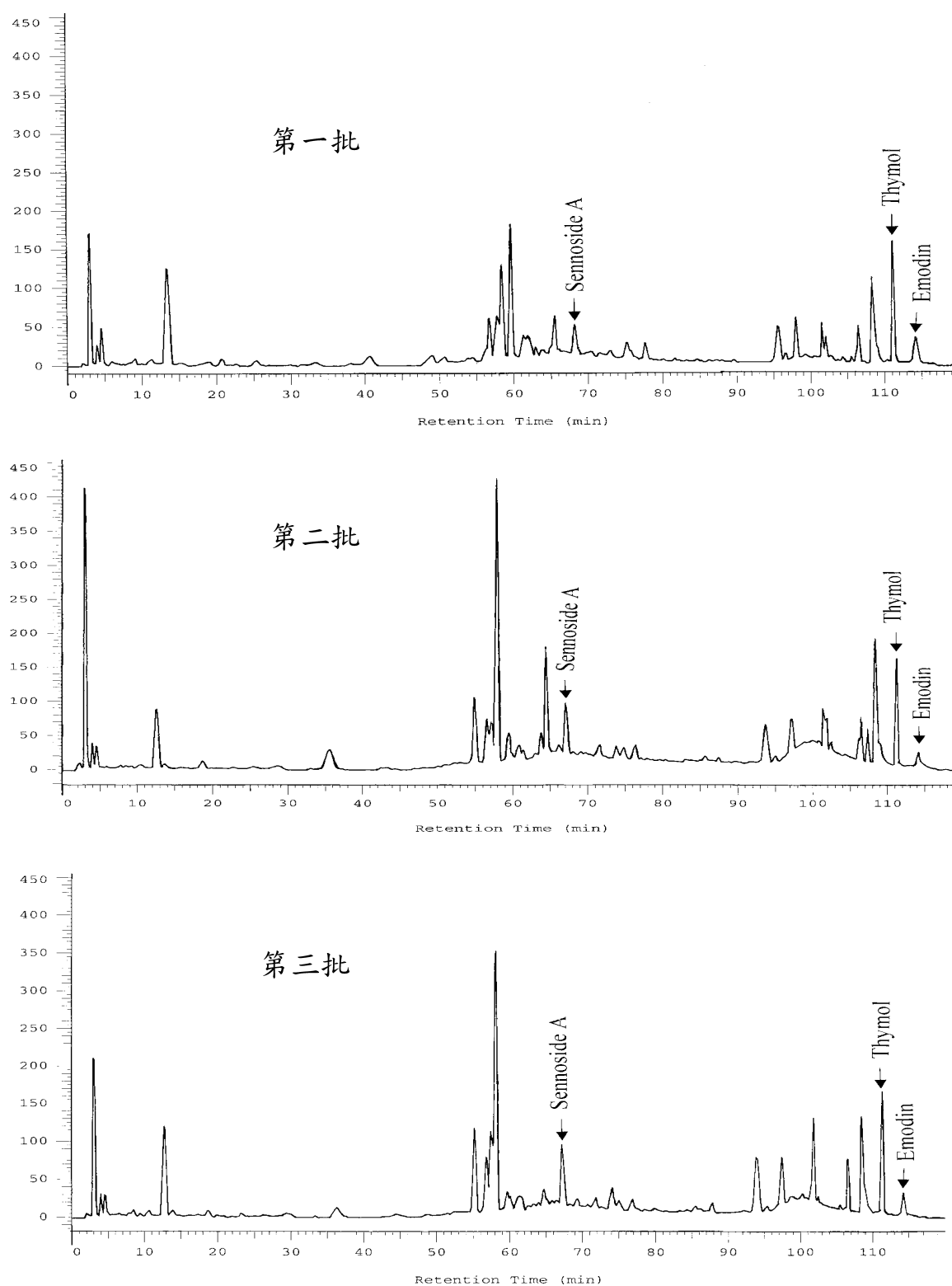


圖 76. 大黃藥材之 HPLC 層析圖

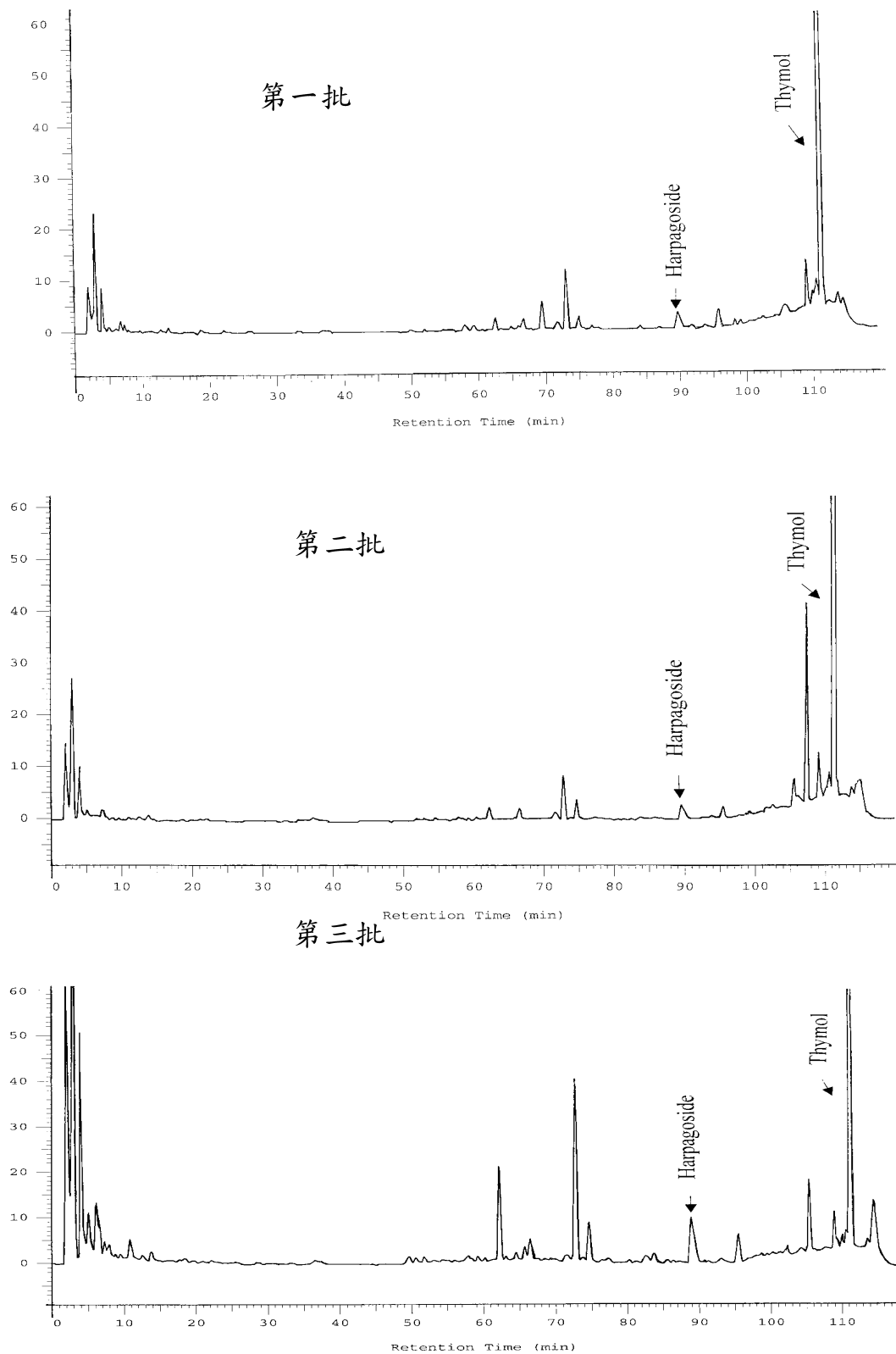


圖 77. 元蓼藥材之 HPLC 層析圖

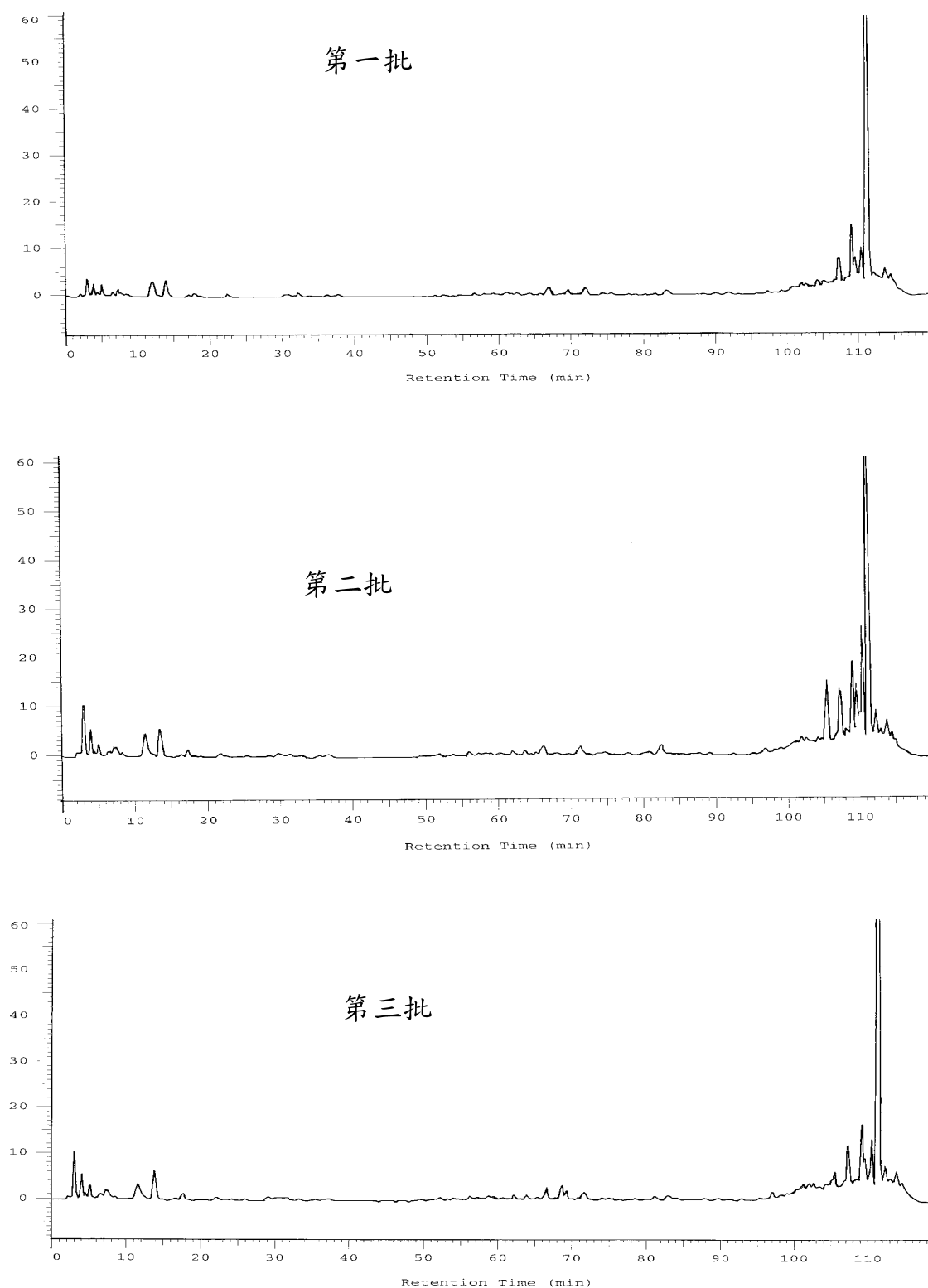


圖 78. 木鯨子藥材之 HPLC 層析圖

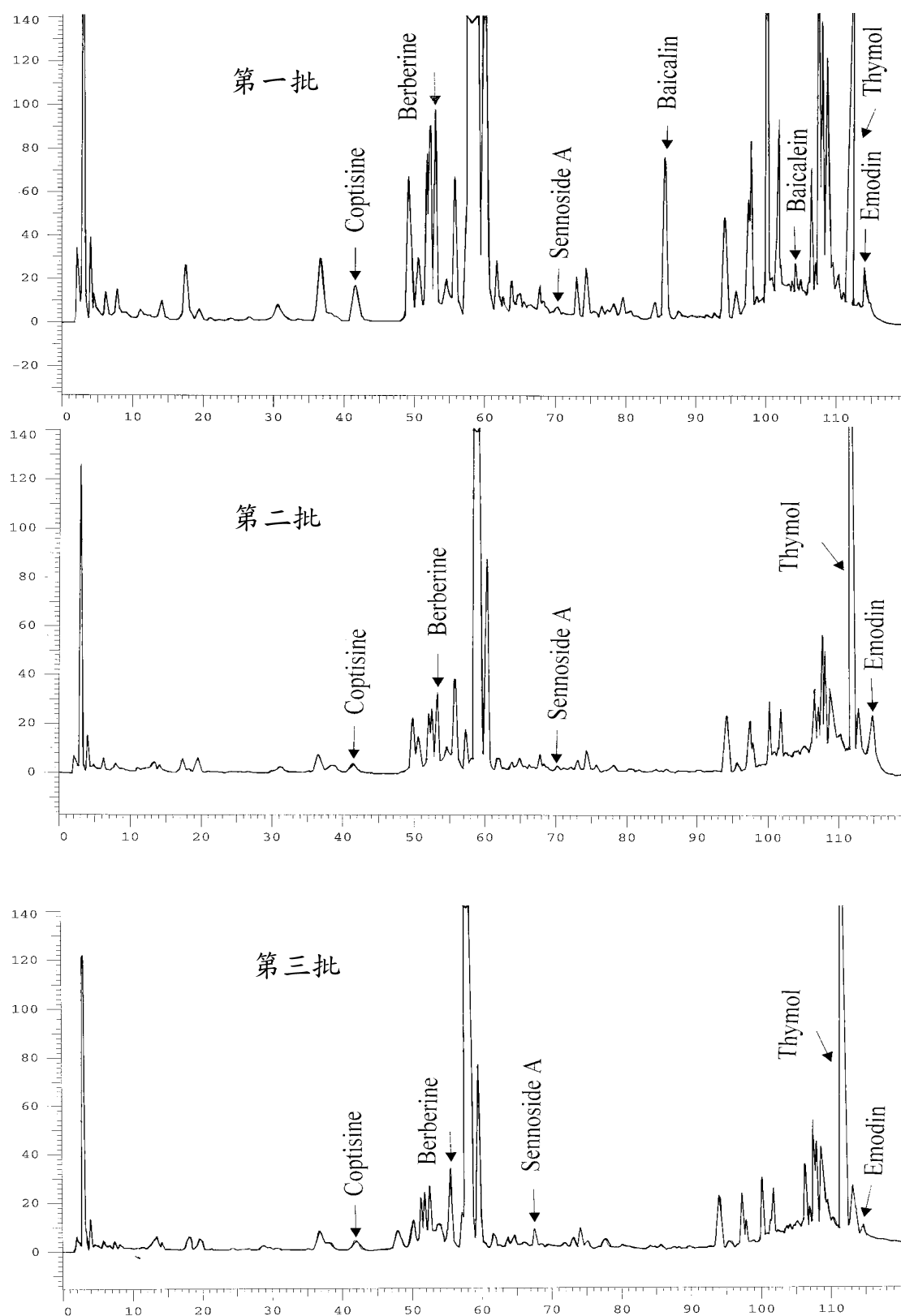


圖 79. 綠云膏油性貼布半成品之 HPLC 層析圖

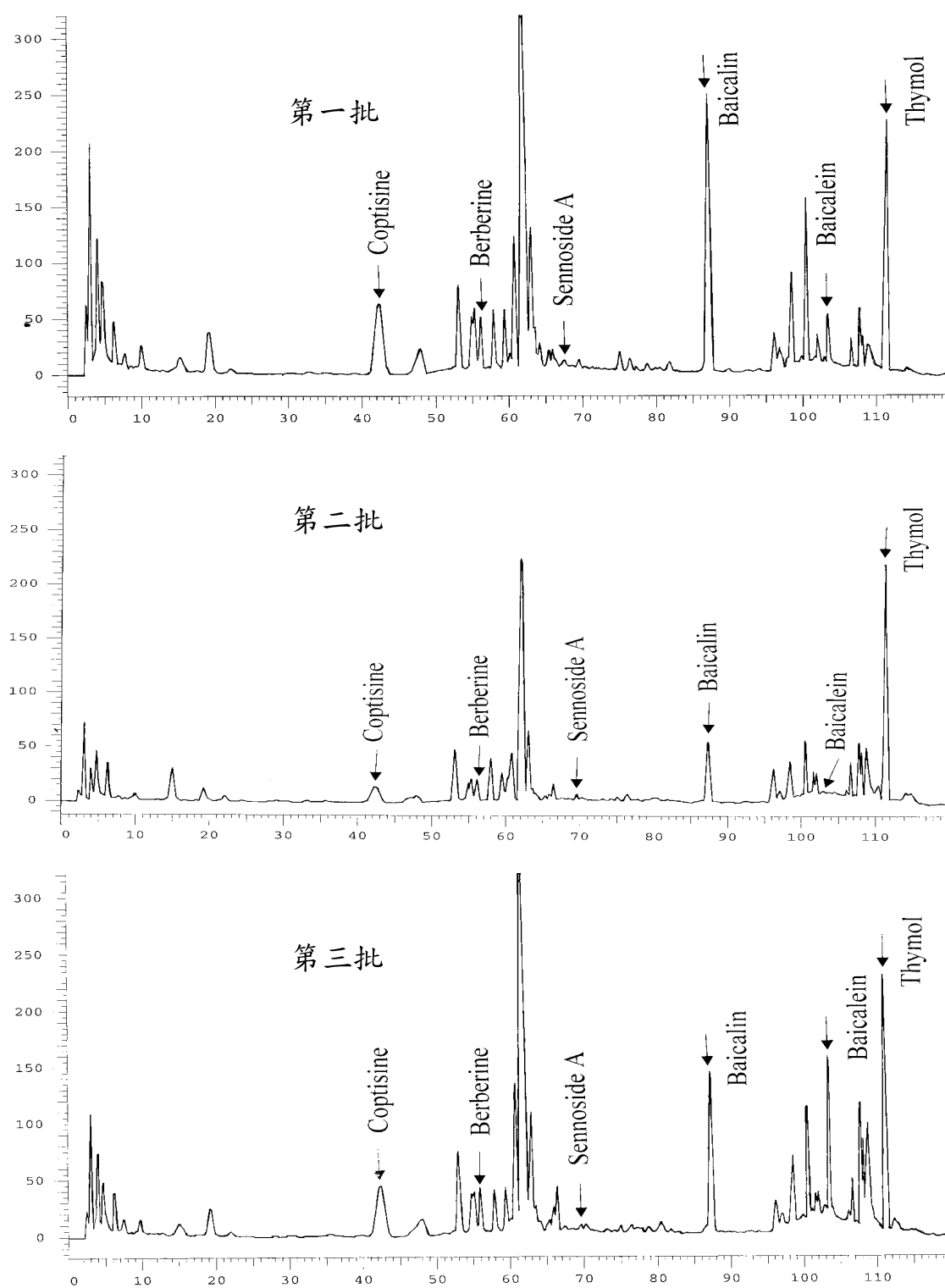


圖 80. 綠云膏水性貼布半成品之 HPLC 層析圖

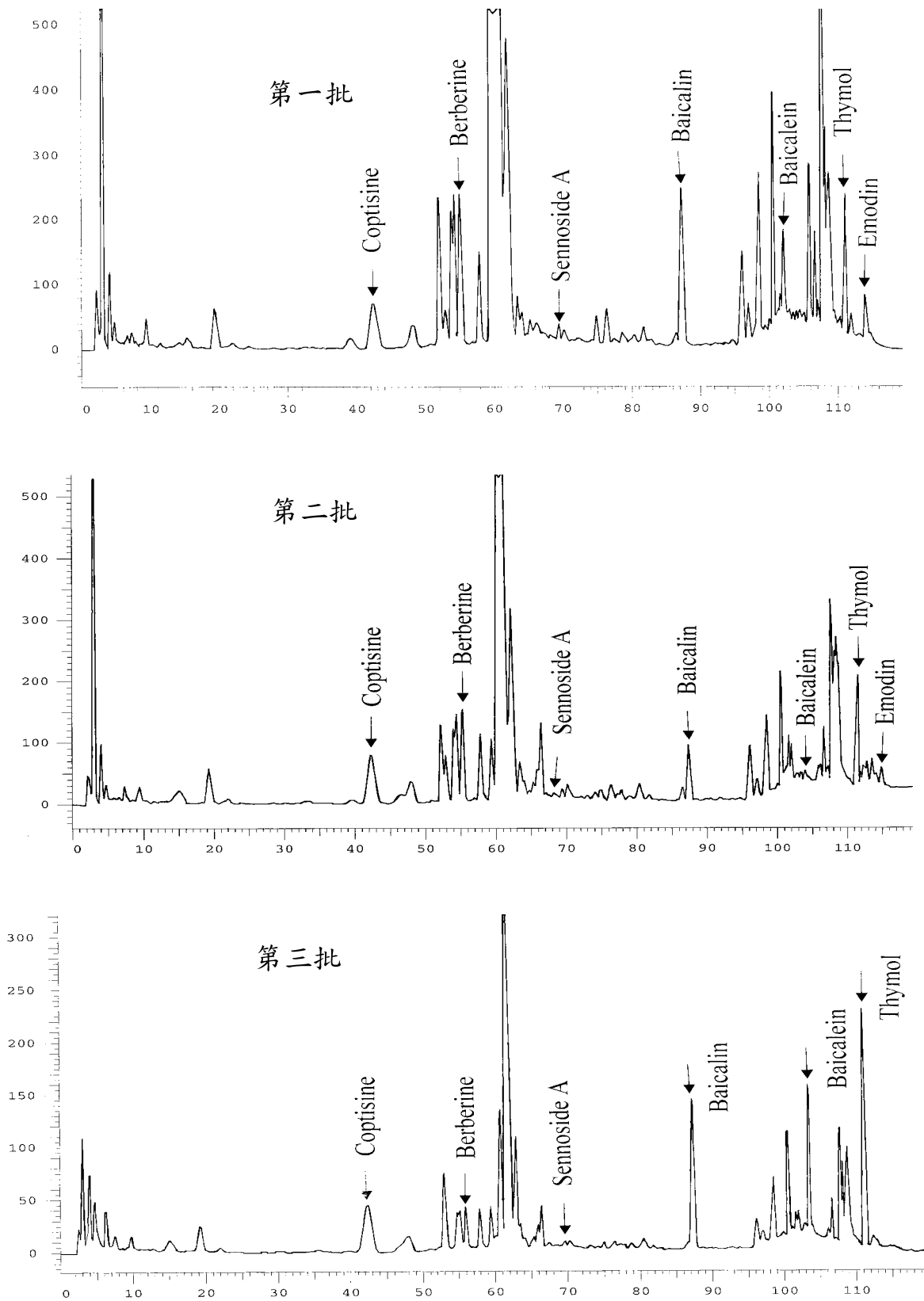


圖 81. 綠云膏油性貼布成品之 HPLC 層析圖

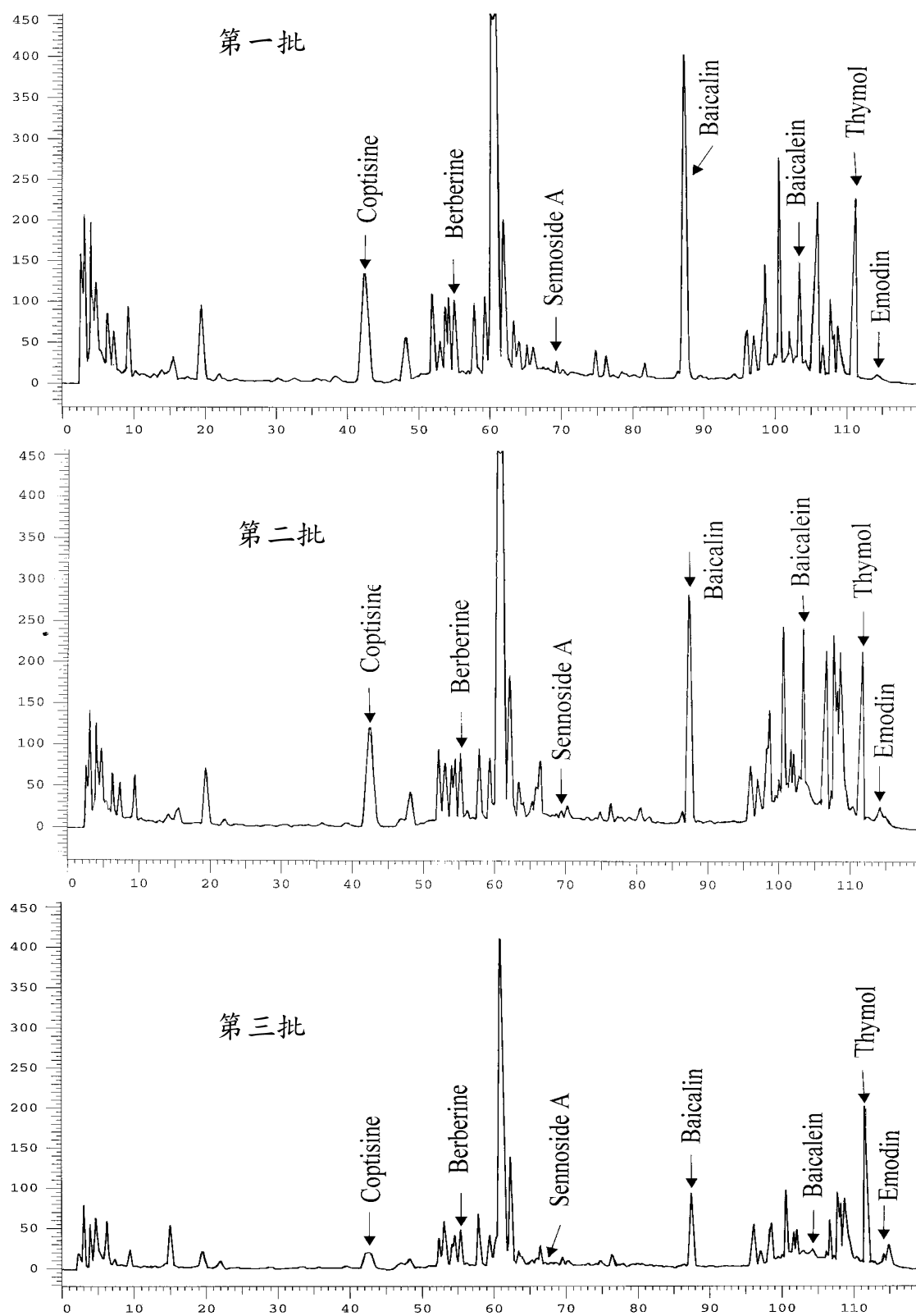


圖 82. 綠云膏水性貼布成品之 HPLC 層析圖

