

編號：CCMP92-RD-111

中藥藥膠布及藥酒製劑之成分分析及其釋出效應之研究（3-3）- 中藥藥膠布的藥效動物實驗

陳福安

大仁技術學院

摘 要

92 年度計畫進行如意金黃散油性與水性藥膠布之皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物試驗。以 Franz cell 裝置進行藥膠布皮膚穿透試驗，並以 HPLC 方法檢測如意金黃散 8 種指標成分之皮膚穿透。48 小時的如意金黃散-油性與水性藥膠布皮膚穿透 HPLC 層析圖，結果未發現已知指標成分之皮膚穿透，然發現有其他不明成分之皮膚穿透。止痛藥效動物試驗是以小白鼠 Writhing 試驗模式分析動物給予如意金黃散油性與水性藥膠布後抵抗醋酸溶液刺激所引起之疼痛扭曲次數來評估其止痛效果。本試驗進行如意金黃散油性與水性藥膠布之止痛藥效評估，結果發現如意金黃散-油性及水性藥膠布與負控制組均具有顯著的差異 ($p < 0.01$)，其中如意金黃散-油性比如如意金黃散-水性藥效好 ($p < 0.05$)。依止痛效果大小依序為如意金黃散-油性藥膠布 $>$ 市售 Indomethacin 藥膠布 \approx 如意金黃散-水性藥膠布。抗腫脹藥效動物試驗則以腫脹測定儀測定藥膠布舒緩 Carrageenan 引起足蹠腫脹之效能。本試驗進行如意金黃散油性與水性藥膠布之抗腫脹藥效評估，結果發現兩者均有抗腫脹藥效 ($p < 0.01$)，與市售 Indomethacin 藥膠布效果相當 ($p > 0.05$)。消炎藥效是測定藥膠布抑制組織胺引起 Pontamine sky blue 染劑滲出之能力，結果顯示如意金黃散-水性與油性藥膠布均無顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出 ($p > 0.05$)。

關鍵詞：藥膠布、皮膚穿透、藥效、止痛、抗腫脹、消炎

CCMP92-RD-111

Studies on the component analysis and the effect of release of marker components in plaster formulas and tonic wine formulas.

(3-3) - The animal experiment for efficacy of plaster formulas.

Fu-An Chen

Tajen Institute of Technology

ABSTRACT

The objective of this project is to evaluate the skin penetration, anti-edematous, anti-inflammatory and analgesic activities of prepared oily and aqueous Ru-I-kin-huang-san plasters. Franz cell apparatus was used to evaluate the skin penetration of plasters. The skin penetration of 8 marker components of Ru-I-kin-huang-san plaster was monitored by a HPLC method. After 48 hours, the 8 marker components were not detected but a number of unknown components in skin penetration experiment. The writhing test was used to determine the analgesic activity of the plasters. The results revealed that both Ru-I-kin-huang-san oily and aqueous plasters possessed significant analgesic activity. The analgesic efficacy is in the order of Ru-I-kin-huang-san oily plaster > Indomethacin plaster \approx Ru-I-kin-huang-san aqueous plaster. Plethysmometer apparatus is applied to evaluate the anti-edematous activities against carrageenan-induced paw edema. The results found that both Ru-I-kin-huang-san oily and aqueous plasters had significant anti-edematous activity. Their efficacies are similar to that of Indomethacin plaster. Analysis of the dye leakage is employed to examine the anti-inflammatory efficacy of rats confronted with histamine-induced capillary permeability. The results found that both Ru-I-kin-huang-san oily and aqueous plasters had no significant efficacy

on inhibition of histamine-induced capillary permeability.

Keywords: Plaster, Skin penetration, Efficacy, analgesic activity, anti-inflammation, anti-edema

壹、前言

中國醫藥自有文字記載以來已有數千年的悠久歷史，它融合中國歷代祖先長期與疾病對抗奮鬥的豐富經驗，具有悠久之臨床經驗。中草藥有數千至萬種動植與礦物藥物，其研究題材相當豐富，在加上西方醫藥面臨一些開發瓶頸，使得現代醫藥之設計靈感與製藥技術逐漸取材中草藥，以致中草藥成為國內外具前瞻性之一門科學。我國本著具有豐富資源及歷史悠久的中醫藥使用經驗之優厚條件，在今 21 世紀為生物科技之時代，「中草藥開發」為目前政府推動生物技術產業之主要政策之一，更可由行政院在民國 84 年即頒訂「加強生物技術產業推動方案」，將中草藥之傳統藥物已被列為重點推動項目之一。又行政院八十九年五月所召開第四次生物技術產業策略（SRB）會議，將以國家型計畫來發展中草藥，經濟部所報「中草藥產業技術發展五件計畫」也經行政院同意在案，進行相關的研究，看出政府對中草藥開發的重視。

衛生署中醫藥委員會也致力將中草藥研發創造，成為台灣電子藥景之重現，將中草藥研究發展與現代生化科技結合，提昇台灣成為中草藥科技島，並將健康食品、特殊療效之方劑、中藥化妝品、藥酒及貼布等，列為重點發展品項。藥膠布有效成分及其釋出情形之探討更被列為今後三年度之重點研究項目。

藥膠布（貼布、膏藥）在國內為佔有相當大市場之一種外用製劑，一般用於用於消腫、消炎及止痛等之醫療用途上。外用製劑一般分有局部性、區域性及系統性經皮吸收製劑¹，而藥膠布大致屬局部性及區域性外用製劑，不管是局部性、區域性及系統性作用製劑，均要經皮吸收以產生療效。外用製劑有較少之副作用及免於口服製劑受肝臟之 First-pass 效應與胃腸破壞成份之優點，一般被認為理想之劑型²。目前藥膠布之傳統製法係以麻油或香油與藥材浸泡後，再加熱、熬煮、抽取，再將抽取物與橡膠、樹脂類物質混合均勻，塗於適宜的裱被材料上。但在藥膠布之製程中，對麻油抽取之條件；成分的安定性；成分之分析；藥膠布之安全性（皮膚刺激性）；藥膠布中成份的皮膚穿透；及其藥效如消腫、消炎及止痛評估，皆無一可行性檢驗與評估標準。因此建立一套包含前述項目之完整藥膠布品質評估標準依據是當前的重點課題。藥膠布除成份含量分析控管外，其藥效則是最終製劑展現之結果，亦為消費者最關心之訊息。因藥膠布為外用製劑故其成份的皮膚穿透直接影響其製劑的藥效。又觀目前國內在中藥藥膠布成份的皮膚穿透及藥效如止痛、消腫與消炎評估仍尚待建立。為求完整性，本子計畫將配合研究重點項目『探討藥膠布中有效成份及其釋出情形之研究』群體計畫建立藥膠布成份的皮膚穿透及藥效評估動物模式

以對所製備成的油性及水性藥膠布進行成份皮膚穿透及止痛、消腫與消炎藥效評估，以確保藥膠布製劑品質與有效性，而達到品質管制的目的。

本計劃屬連續計劃，91 年度已完成萬應膏及綠云膏油性及水性藥膠布的成份皮膚穿透及止痛、消腫與消炎藥效評估。92 年度將繼續完成評估其他子計畫所製備之如意金黃散油性及水性藥膠布的成份皮膚穿透及止痛、消腫與消炎藥效。所得結果將可作為藥廠及相關單位之在藥膠布皮膚穿透及其藥效評估上之依據與參考。

貳、材料與方法

2.1 試藥與材料

Glacial acetic acid 【Merck, Germany】、Pyridine【Fisher, USA】、Acetonitrile 【Fisher, USA】、DDW、sodium azide 【Ferak, Germany】、carrageenan lambda 【Sigma, USA】。Glycyrrhizin 【Nacalai tesque, Japan】、Sennoside A 【Extrasynthese, France】、Sennoside B【Extrasynthese, France】、Emodin (90%) 【Sigma, USA】、Hesperidin 【Sigma, USA】、Curcumin 【Sigma, USA】、Imperatorin 【Extrasynthese, France】、Magnolol 【Nacalai tesque, Japan】及 Indomethacin 【Sigma, USA】。

每片如意金黃散藥膠布 (14×10.3 cm) 藥材含量相當於桔樓根 500mg、黃柏、大黃、薑黃、白芷 250 mg、厚朴、陳皮、甘草、蒼朮、生天南星 100 mg 所抽出之萃取物。愛斯貼布 (正控制組，衛署藥輸字第 023119 號)：每公克含 Indomethacin 3.75 mg，每一貼布 (14cm×10cm，14 g) 中含有 52 mg 的 Indomethacin，即每 cm² 貼布含有 Indomethacin 0.37 mg。

2.2 HPLC 儀器

HPLC 儀器：系統泵浦 【Shimadzu, LC-10AT, Japan】、UV 檢測儀 【Shimadzu, SPD-10A, Japan】、積分系統【訊華數據處理系統】、自動注入器 【Jasco, Japan】、脫氣裝置 【Gastorr】。

2.3 如意金黃散 8 種指標成分之 HPLC 分析條件

本方法針對如意金黃散中 Sennoside A、Sennoside B、Emodin (大黃)、Curcumin (薑黃)、Imperatorin (白芷)、Magnolol (厚朴)、Hesperidin (陳皮)、Glycyrrhizin (甘草) 8 種指標成分所建立之 HPLC 分析方法其條件為：管柱【Cosmosil 5C18-MS-II, 5 μ m 250 \times 4.6 mm, Japan】、UV 檢測波長為 250 nm、感度範圍為 0.02 AUFs、樣本液分析量 100 μ L。梯度沖提 (gradient elution)、流速為 1.0 mL/min。梯度程式：(A 溶液為 1 % glacial acetic acid、B 溶液為 acetonitrile)

2.4 皮膚穿透性動物試驗³⁻⁴

試驗動物為 ICR 小白鼠 (公；7 週齡；23-32 g)。試驗期間，飼料飲水均採任食。試驗共分為二組，分別為如意金黃散油性及水性藥膠布。小白鼠先行頸椎斷離犧牲 (圖一)，再以電動剃毛器剃除腹部毛髮，取下腹部皮膚 (圖二)。取下的皮膚，內部以生理食鹽水濕潤後，夾在 Franz cell 滲透裝置的 Donor cell 與 Receptor cell 間，同時將藥膠布 (2 \times 2 cm) 則置於皮膚上方 (圖三)。Receptor cell 充滿生理鹽水 (含 0.03 % sodium azide) 於 32°C 恆溫與 500 rpm 固定速度攪拌下進行皮膚的穿透試驗，並於不同時間點採樣，將樣本注入 HPLC 中進行分析藥膠布指標成分之皮膚穿透情形。

2.5 止痛藥效動物試驗⁵

試驗動物為 ICR 小白鼠 (公；7 週齡；24-33 g)。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 (市售 Indomethacin 藥膠布) 及實驗組 (如意金黃散的油性與水性藥膠布)，每組 6 隻。

小白鼠稱重編號，然四肢固定於平板並進行腹部剃毛後，將藥膠布 (2 \times 3 cm) 貼於小白鼠的腹部上 (圖四)。3 小時後去除藥膠布，以 0.6 % 醋酸溶液行腹腔注射 (i.p., 20 mL/kg)。觀察 10 分鐘內，小白鼠的 Writhing 次數 (圖五)。

2.6 抗腫脹藥效動物試驗⁶⁻⁷

試驗動物為 Wistar 大白鼠 (公；7-8 週齡；170~218 g)。試驗期間，飼料

Time	A(%)	B(%)
0-12 minutes	83	17
12-24 minutes	70	30
24-29 minutes	60	40
29-39 minutes	40	60
39-50 minutes	20	80
50-60 minutes	83	17

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（市售 Indomethacin 藥膠布）及實驗組（如意金黃散的油性與水性藥膠布），每組 6 隻。

將大白鼠稱重編號，並於大白鼠的兩足蹠以簽字筆，劃一「測量線」（圖六）。以腫脹測定儀（Plethysmometer；腫脹測定液：2 ml 腫脹液加入 180 ml 之 0.065 % NaCl in H₂O），先測量其兩足蹠之體積（圖七）。先穿自製（不同規格）束腹彈性繃帶以避免老鼠咬掉藥膠布（圖八）。貼藥膠布（2×3 cm）於兩足蹠，並以 3M 透氣膠帶固定（圖九）。1 小時後，皮內注射 0.1mL 的 Carrageenan（10 mg/mL in saline）於兩足蹠，再貼新的藥膠布於兩足蹠，再以腫脹測定儀測量 3 小時後之腫脹百分比。

（注射後 3 小時的腫脹後體積-注射後 0 小時的腫脹後體積）

腫脹百分比(%) = ----- × 100
注射後 0 小時的腫脹後體積

2.7 消炎藥效動物試驗⁸

試驗動物為 Wistar 大白鼠（公；7-8 週齡；175-235 g）。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（市售 Indomethacin 藥膠布）及實驗組（如意金黃散的油性與水性藥膠布），每組 6 隻。

將大白鼠稱重編號，行腹部剃毛後，取藥膠布（4×4 cm）貼於腹部上並以 3M 透氣膠帶先固定（圖十），後穿自製（不同規格）束腹彈性繃帶以避免老鼠咬掉藥膠布。3 小時後去除藥膠布，並以簽字筆畫 2×2 cm 面積後，自尾靜脈注射 Pontamine sky blue 6BX 溶液（4 % 溶在無菌水；2.5 mL/kg B.W.）（圖十一）。3 分鐘後，腹部行皮內注射 0.05 mL Histamine（0.33 % in saline）（圖十二）。30 分鐘後犧牲大白鼠，將注有 Histamine 處之皮膚（2×2 cm）取下（圖十三）。經細切後置於離心管（25 mL）內，再加入 3 mL Trichloroacetic acid 溶液（5 % in H₂O）。18 小時後置於研鉢內研磨，研磨後的泥狀物再以適量的 5 % Trichloroacetic acid 溶液洗出，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）震盪萃取 40 分鐘（150 次/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，經試管震盪器震盪 1 分鐘後離心。以 Spectrophotometer 測定“上層液”（Pyridine 層）之 600 nm 吸光度。

2.8 如意金黃散藥膠布中成分之釋放試驗

試驗共分為二組，分別為如意金黃散油性及水性藥膠布。取透析膜

(0.45 μ m, Gelman, USA)後，夾在 Franz cell 滲透裝置的 Donor cell 與 Receptor cell 間，同時將藥膠布 (2 \times 2 cm) 則置於皮膚上方。Receptor cell 充滿生理鹽水 (含 0.03 % sodium azide) 於 32 $^{\circ}$ C 恆溫與 500 rpm 固定速度攪拌下進行成分釋放試驗，並於 48 小時後，將樣本注入 HPLC 中進行分析藥膠布成分釋放情形。

2.9 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。

參、結果

3.1 如意金黃散藥膠布指標成分皮膚穿透性動物試驗

本試驗以 HPLC 進行檢測的指標成分共 8 種 (如圖十四.)，其 HPLC 上最低檢測極限 ($S/N > 3$) 分別為 Sennoside A (0.05 μ g/mL)、Sennoside B (0.05 μ g/mL)、Emodin (0.03 μ g/mL)、Hesperidin (0.1 μ g/mL)、Curcumin (0.05 μ g/mL)、Imperatorin (0.05 μ g/mL)、Magnonol (0.05 μ g/mL) 及 Glycyrrhizin (0.5 μ g/mL)。

8 種指標成分之檢量線 Sennoside A (0.0625 \sim 5 μ g/mL)、Sennoside B (0.0625 \sim 5 μ g/mL)、Emodin (0.0625 \sim 5 μ g/mL)、Hesperidin (0.25 \sim 10 μ g/mL)、Curcumin (0.0625 \sim 5 μ g/mL)、Imperatorin (0.0625 \sim 5 μ g/mL)、Magnonol (0.0625 \sim 5 μ g/mL) 及 Glycyrrhizin (0.5 \sim 10 μ g/mL) 的相關係數 (r^2) 均大於 0.995。8 種指標成分之精密度 (precision) 分析結果如表一所示，其日內 (C.V. = 0.22 \sim 5.34 %) 與日間 (C.V. = 0.41 \sim 5.17 %) 變動均合乎要求，進一步進行穿透成分滲透量之測定。

48 小時的如意金黃散-油性與水性藥膠布皮膚穿透 HPLC 層析圖如圖十五及十六所示，結果發現均未發現此 8 種指標成分之皮膚穿透 (經屏科大賴教授之 HPLC 方法確認亦得相同結果)，然發現有其他不明成分之皮膚穿透。在如意金黃散-油性藥膠布方面，至少有 4 種以上不明成分，而如意金黃散-水性藥膠布方面，穿透不明成分較多，至少有 6 種不明成分。

3.2 止痛藥效動物試驗

將藥膠布 (2×3 cm) 貼於小白鼠的腹部 (已剃毛) 上, 3 小時後去除藥膠布, 腹腔注射 0.6 % 醋酸溶液後, 觀察小白鼠的 writhing 次數, 結果如圖十七所示。結果顯示, 在正控制組 Indomethacin 藥膠布、實驗組如意金黃散-油性及水性藥膠布與負控制組均具有顯著的差異 ($p<0.01$), 其中如意金黃散-油性比如如意金黃散-水性藥效好 ($p<0.05$)。依止痛效果大小依序為如意金黃散-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 \approx 如意金黃散-水性藥膠布。

3.3 抗腫脹藥效動物試驗

將藥膠布 (2×3cm) 貼於大白鼠兩足蹠上。1 小時後, 皮內注射 0.1 mL 的 Carrageenan (10 mg/mL in saline)。注射後, 繼續貼新藥膠布, 3 小時後, 測量其兩足蹠的腫脹, 並評估其腫脹百分比 (%), 其結果如圖十八所示。在抑制腫脹結果顯示, 3 小時後, 正控制組 Indomethacin 藥膠布、實驗組如意金黃散-油性及水性藥膠布與負控制組均具有顯著的差異 ($p<0.01$) 且三組之藥效相當。然繼續觀察 5~8 小時後之結果, 發現正控制組之消腫曲線圖與實驗組有差異, 正控制組在 3 小時時腫脹達最高點, 之後則開始消腫, 然實驗組在 1-3 小時腫脹較快, 然 5-8 小時腫脹趨緩。

3.4 消炎藥效試驗

大白鼠行腹部剃毛後, 取藥膠布 (4×4 cm) 貼於腹部上。3 小時後去除藥膠布, 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 (2×2cm) 取下, 測定其每單位面積皮膚所滲出之 Pontamine sky blue 量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), 結果如圖十九所示。由試驗結果得知正控制組有顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出 ($p<0.01$), 然在實驗組如意金黃散-水性與油性藥膠布均未發現有顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出 ($p>0.05$) 之效果。比較如意金黃散-水性與油性藥膠布之染劑滲出量, 水性似乎比油性少些, 然未達統計之差異。

3.5 如意金黃散藥膠布中成分之釋放試驗

48 小時的如意金黃散-油性與水性藥膠布成分釋放 HPLC 層析圖如圖二十及二十一所示, 結果發現如意金黃散-油性藥膠布之釋放成分種類數比如如意金黃散-水性藥膠布多。

肆、討論

本計劃延續 91 年計畫繼續進行如意金黃散藥膠布油性與水性之皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物試驗。在皮膚穿透試驗：本計劃以所開發與確效過適合監測如意金黃散藥膠布 8 種指標成分的 HPLC 分析法進行指標成分皮膚穿透試驗。在 48 小時後，如意金黃散-油性與水性藥膠布均未發現此 8 種指標成分之皮膚穿透，經屏科大賴教授之 HPLC 方法確認亦得相同結果，然發現有其他不明成分之皮膚穿透。在如意金黃散-油性藥膠布至少發現有 4 種以上不明成分之穿透，而如意金黃散-水性藥膠布發現穿透之未知成分較多，至少有 6 種不明成分。基於能穿透皮膚的成分種類與量有差異，反映水性與油性不同基劑會決定藥膠布皮膚穿透的成分種類與穿透量，因此藥膠布的皮膚穿透試驗為基劑配方的最佳化設計之評估指標之一，可作為藥膠布品管上比對之依據。

在止痛效果方面，如意金黃散-油性及水性藥膠布均具有顯著止痛功效，其中如意金黃散-油性比如如意金黃散-水性藥膠布藥效好，與釋放成分之種類數有相關性。依止痛效果大小依序為如意金黃散-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 ≈ 如意金黃散-水性藥膠布。基於皮膚角質屬親油特性，理論上會穿透皮膚之成分應屬親油性成分，在成分釋放試驗已發現油性藥膠布之成分釋放種類均比水性藥膠布多，並具有較佳之止痛藥效，然觀傳統如意金黃散以水攪拌後外敷理論上可能使親油性成分較難釋放以致藥效不佳，因此以水攪拌後外敷之傳統使用法可能較不恰當。在抗腫脹效果方面：如意金黃散-油性及水性藥膠布在 3 小時後均具有顯著的抗 Carrageenan 引起之腫脹作用，此功效上如意金黃散-油性、如意金黃散-水性及市售 Indomethacin 藥膠布之抗腫脹效果相當。然繼續觀察 5~8 小時後之結果，發現正控制組之消腫曲線圖與實驗組有差異，正控制組在 3 小時時腫脹達最高點，之後則開始消腫，然實驗組在 1-3 小時快速腫脹，然 5-8 小時腫脹趨緩。此結果可藉穿透曲線（圖二十二與二十三）說明，觀察正控制組與實驗組之不明成分（以不明成分 A 為例）之穿透曲線趨勢不同，正控制組之 Indomethacin 穿透量一直持續上升，之故消腫藥效可持續發揮；然實驗組之不明成分穿透量慢慢趨於緩和而使消腫藥效無法持續，因而呈現消腫功效後繼無力之現象。在消炎效果試驗：如意金黃散-油性及如意金黃散-水性均無顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出。整體觀察，如意金黃散之藥效主要為止痛與抗腫脹功效。比較藥效結果與成分釋放種類數有相關性，皮膚穿透與透析膜成分釋放監測是藥膠布品質管制之重要指標。

在如意金黃散藥效貢獻中藥推測上，止痛效果方面以根據中藥藥理資料，

目前如意金黃散中藥組成中有止痛藥效的中藥種類有枳椇根⁹、白芷¹⁰、厚朴¹¹、甘草¹²、天南星¹²等，因此如意金黃散之止痛藥效可能與以上五種中藥有關。在消腫效果方面，目前如意金黃散中藥組成中有抗腫脹藥效的中藥種類有枳椇根⁹、黃柏¹³、薑黃¹²、厚朴¹¹等，因此如意金黃散之抗腫脹藥效可能與以上四種中藥有關。以上中藥藥理之資料常以萃取物進行試驗所得之結果，加上中藥藥膠布所含中藥組成多其成分更是複雜，以上藥膠布中的有效中藥在藥效上之貢獻只能作推測。

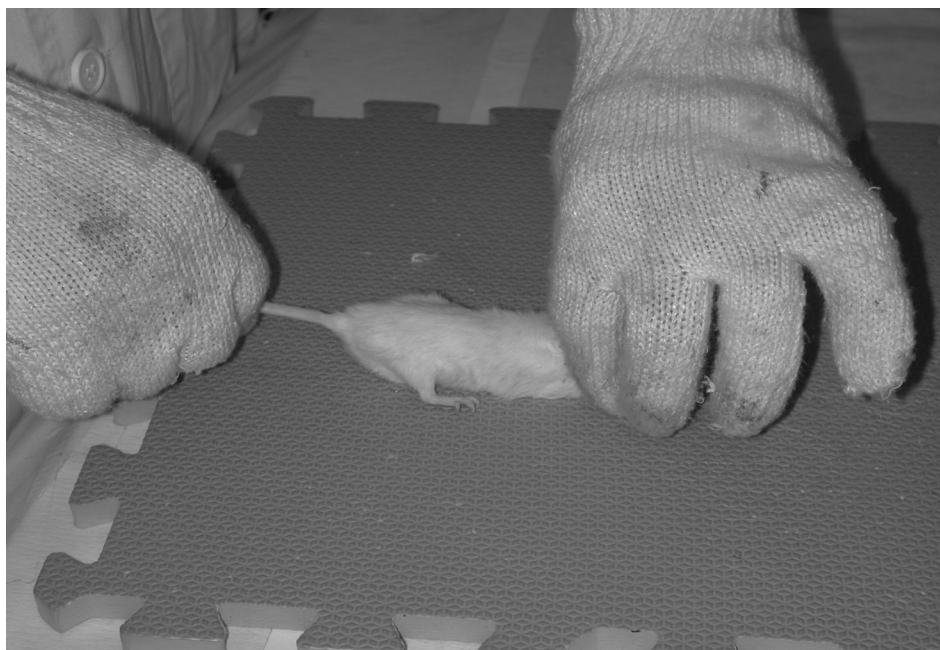
伍、結論與建議

- 一、本計劃已完成如意金黃散油性與水性藥膠布之皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物評估藥效之評估。
- 二、皮膚穿透試驗：本計畫以 HPLC 分析法進行如意金黃散 8 種指標成分皮膚穿透試驗，48 小時後如意金黃散-油性與水性藥膠布均未發現此 8 種指標成分之皮膚穿透（經屏科大賴教授之 HPLC 方法確認亦得相同結果），然發現在如意金黃散-油性藥膠布方面，至少有 4 種以上未知成分，而如意金黃散-水性藥膠布方面，穿透未知成分較多，至少有 6 種未知成分。
- 三、藥膠布皮膚穿透試驗可提供藥廠作為基劑配方的最佳化設計評估指標之一，其 HPLC 穿透層析圖亦可作為藥膠布品管上比對之依據。
- 四、止痛功效方面：如意金黃散-油性及水性藥膠布均具有顯著止痛功效，其中如意金黃散-油性比如如意金黃散-水性藥膠布藥效好。依止痛效果大小依序為如意金黃散-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 ≈ 如意金黃散-水性藥膠布。此藥效與釋放成分之種類數有相關性。
- 五、抗腫脹效果方面：如意金黃散-油性及水性藥膠布均具有顯著的抗腫脹作用。如意金黃散-油性、如意金黃散-水性及市售 Indomethacin 藥膠布之抗腫脹效果相當。
- 六、消炎藥效試驗：如意金黃散-油性及如意金黃散-水性均無顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出。
- 七、整體觀察，如意金黃散之藥效主要為止痛與抗腫脹功效，不同藥膠布基劑會影響藥膠布之穿透成分與釋放成份種類與穿透量，進而支配其藥效之展現。

陸、參考文獻

1. Gurny R, Teubner A, Dermal and Transdermal Drug Delivery-New Insights and Perspectives, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1993.
2. Kitagawa S, Hosokai A, Kaseda Y, Yamamoto N, Kaneko Y, Matsuoka E. Permeability of Benzoic Acid Derivatives in Excised Guinea Pig Dorsal Skin and Effects of L-menthol. *Int. J. Pharm.* 1998; 161: 115-122.
3. Kitagawa S, Li H, Sato S. Skin Permeation of Parabens in Excised Guinea Pig Dorsal Skin, Its Modification by Penetration Enhancers and Their Relationship with n-octanol/water Partition Coefficients. *Chem. Pharm. Bull.* 1997; 45(8): 1354-1357.
4. Chen FA, Wu AB, Huang KK, Liao JW, Chen CY. Enhancement of the Skin Penetration of Alkannin/shikonin Enantiomers by Tooki Extract. *Chin. Pharm. J.* 2001; 53(1): 15-25.
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.
8. Tanaka S, Tajima M, Tsukada M, Tabata M. A Comparative Study on Anti-inflammatory Activities of the Enantiomers, Shikonin and Alkannin. *J. Nat. Prod.* 1986; 49(3): 466-469.
9. Ozaki Y, Xing L, Satake M. Antiinflammatory effect of *Trichosanthes kirilowii* Maxim, and its effective parts. *Biolo. & Pharm. Bull.* 1996 ; 19(8):1046-1048.
10. Li H, Dai Y, Zhang H, Xie C. Pharmacological studies on the Chinese drug radix *Angelicae dahuricae*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1991 ; 16(9):560-2, 576.
11. Wang JP, Hsu MF, Raung SL, Chen CC, Kuo JS, Teng CM. Anti-inflammatory and analgesic effects of magnolol. *N-S Arch Pharmacol.* 1992 ; 346(6): 707-712.
12. 中藥藥理及應用，啟業書局，1986；pp105, 167, 892。
13. Cuellar MJ, Giner RM, Recio MC, Manez S, Rios JL. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. *Fitoterapia* 2001 ; 72(3): 221-229.

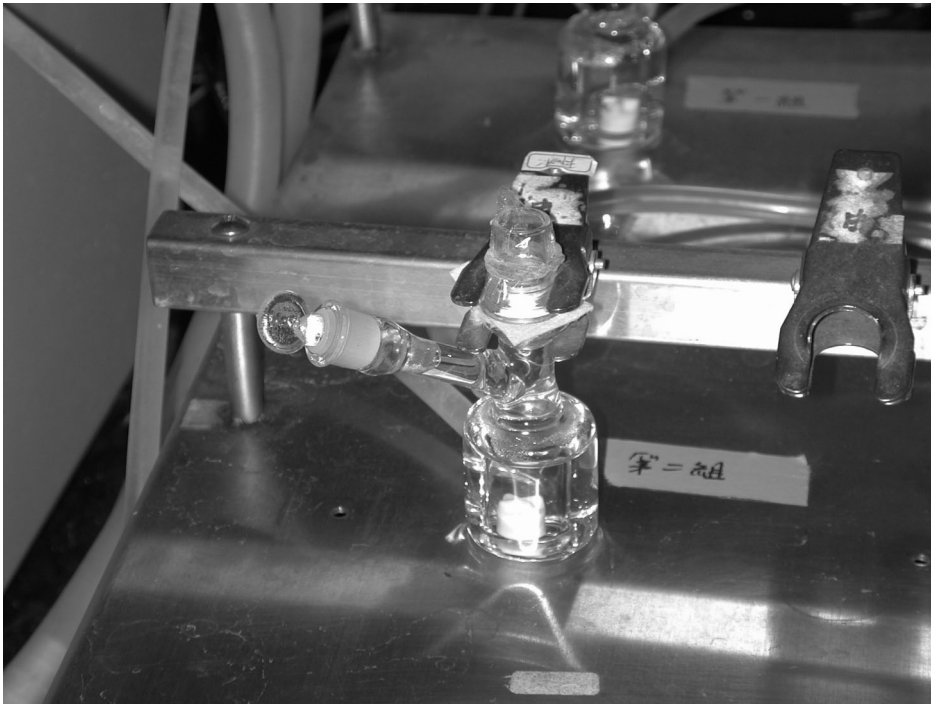
柒、圖、表



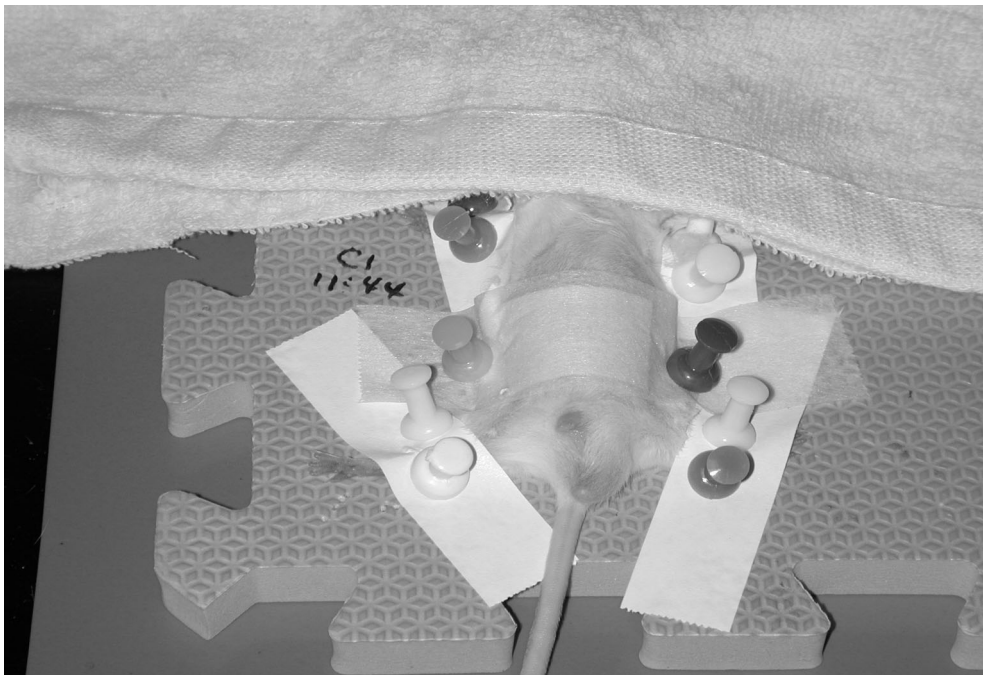
圖一、皮膚穿透試驗：小白鼠頸椎斷離犧牲圖



圖二、皮膚穿透試驗：小白鼠腹部皮膚取下圖



圖三、皮膚穿透試驗：以 Franz cell 進行藥膠布成分穿透圖



圖四、止痛試驗：藥膠布貼於小白鼠腹部圖



圖五、止痛試驗：小白鼠 Writhing 圖



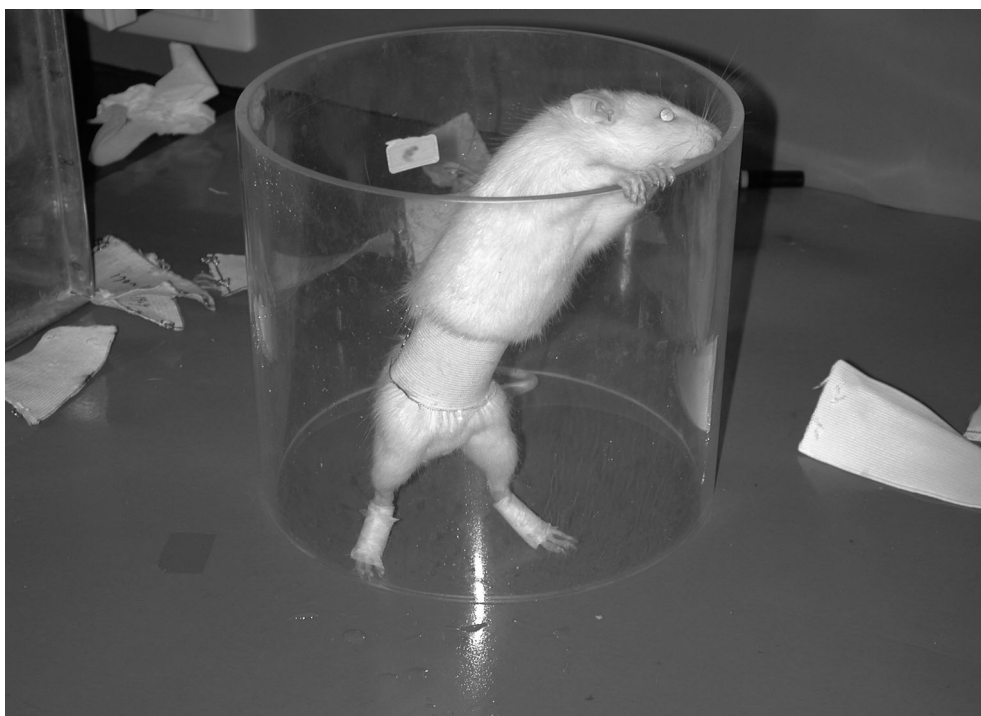
圖六、抗腫脹試驗：大白鼠足蹠畫測量線圖



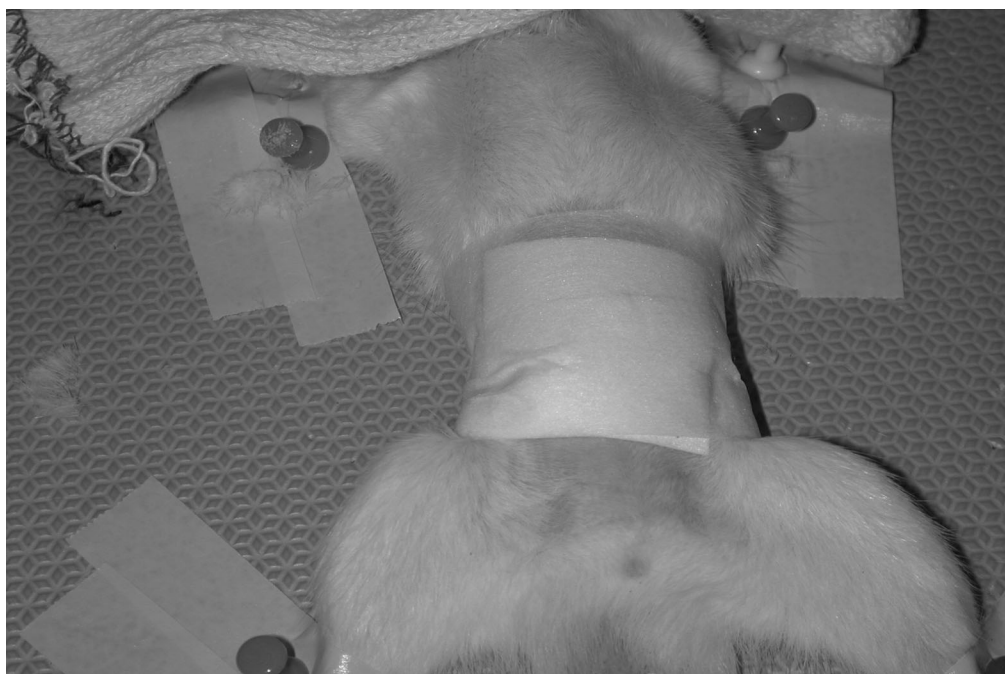
圖七、抗腫脹試驗：大白鼠足蹠體積測量圖



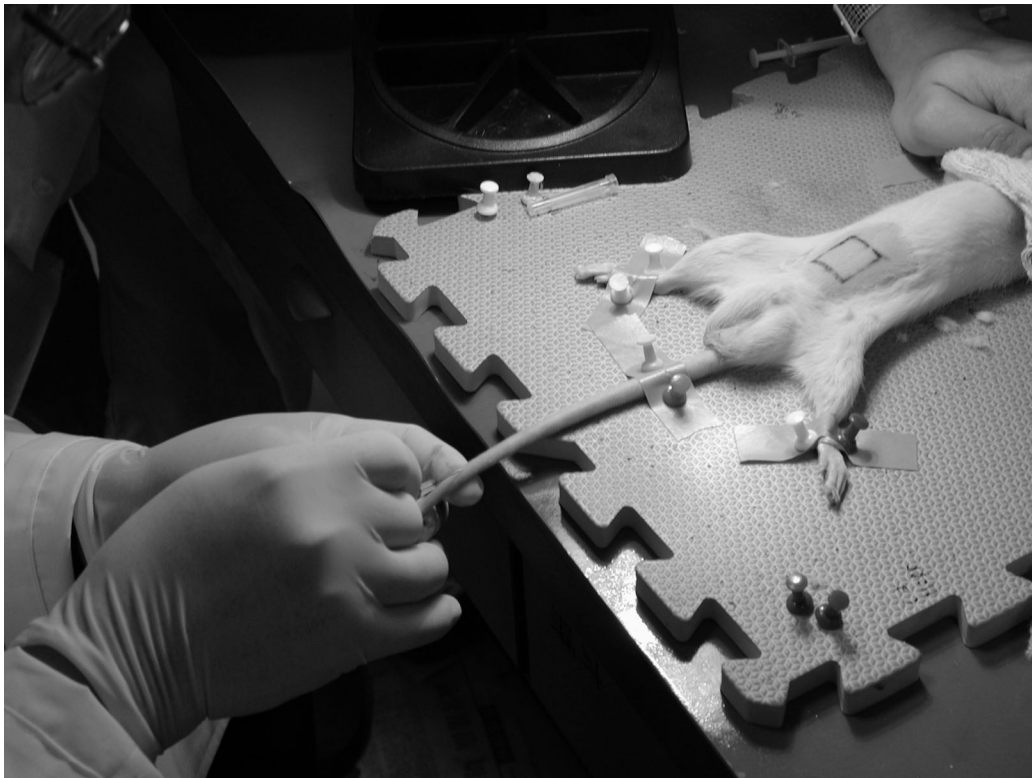
圖八、抗腫脹試驗：大白鼠穿自製束腹彈性繃帶圖



圖九、抗腫脹試驗：大白鼠足蹠貼藥膠布及透氣膠帶固定圖



圖十、消炎試驗：大白鼠腹部貼藥膠布及透氣膠帶固定圖



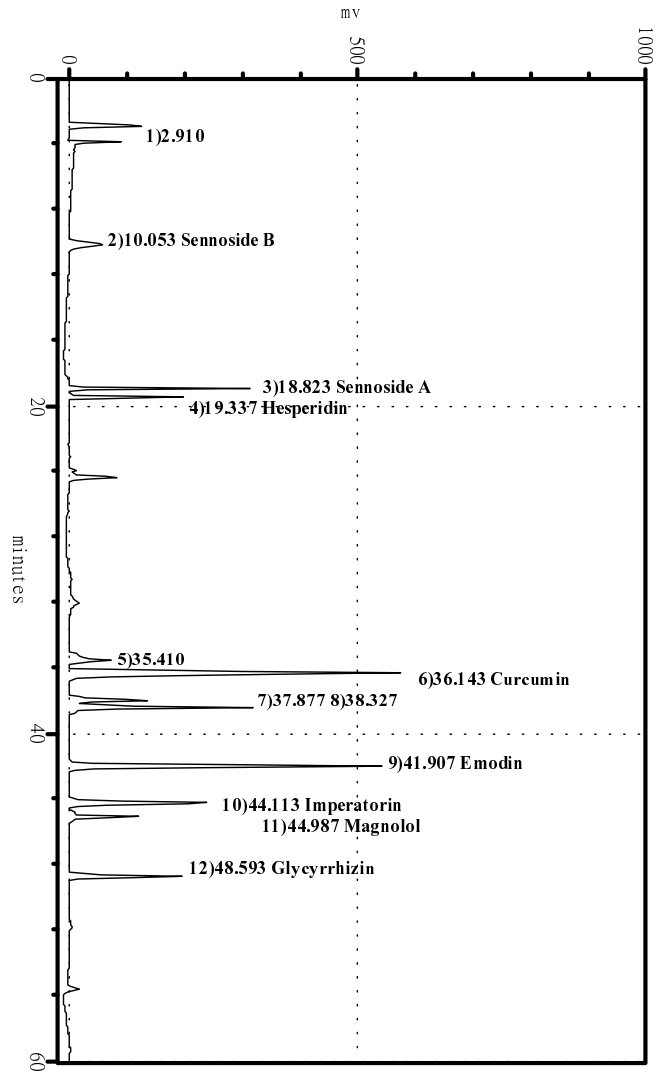
圖十一、消炎試驗：自大白鼠尾靜脈打入染劑圖。



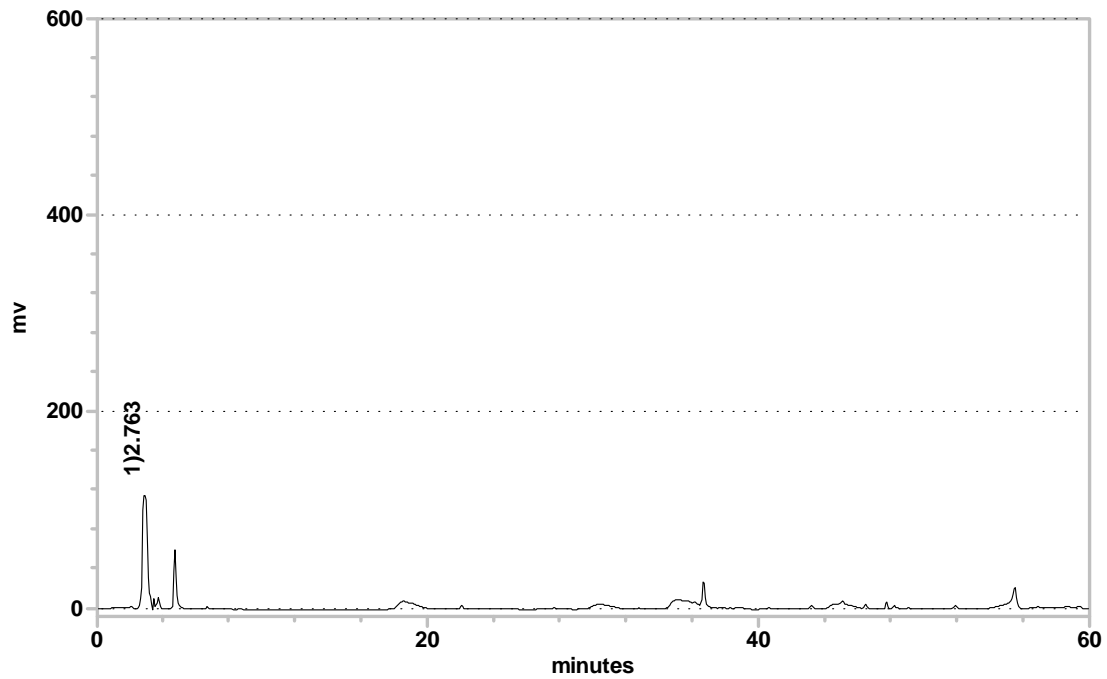
圖十二、消炎試驗：腹部皮內注射 0.05 mL 組織胺



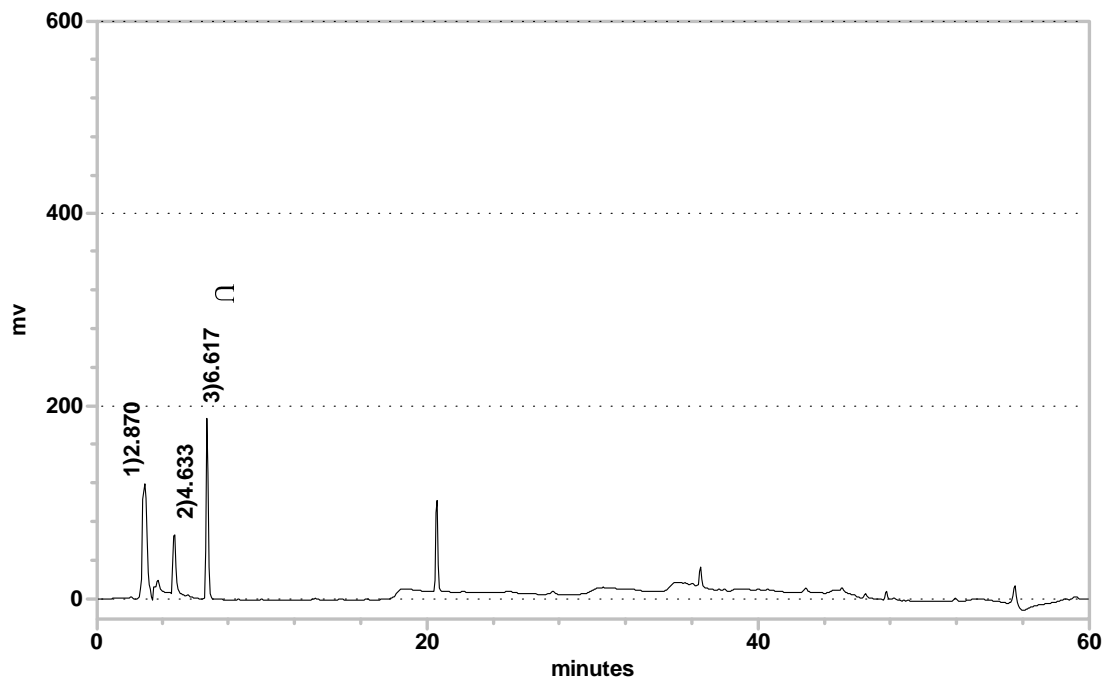
圖十三、犧牲大白鼠取下皮膚圖



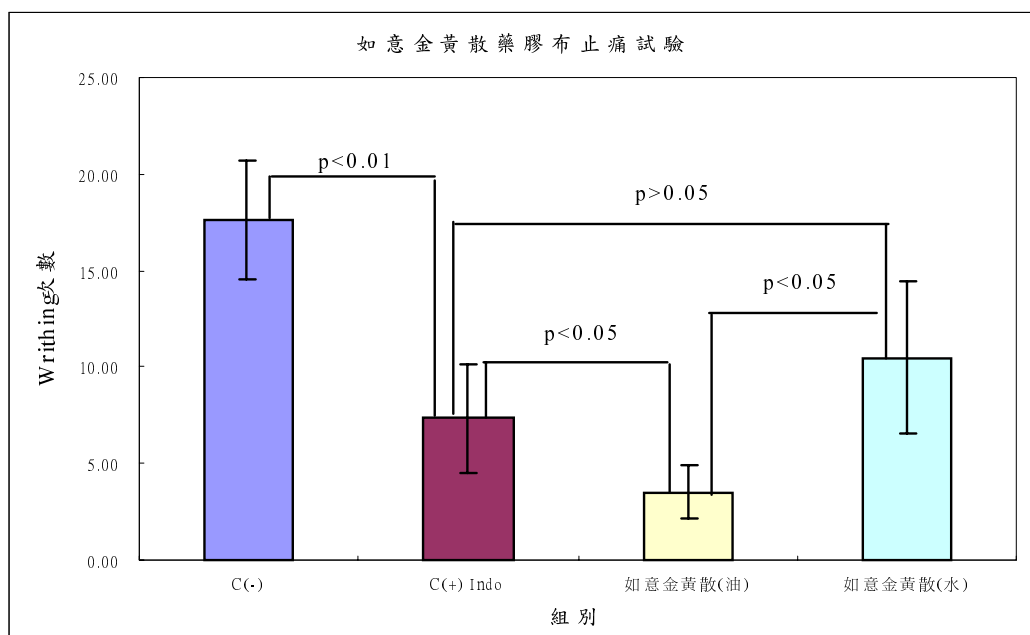
圖十四、如意金黃散指標成分(8種)之層析圖



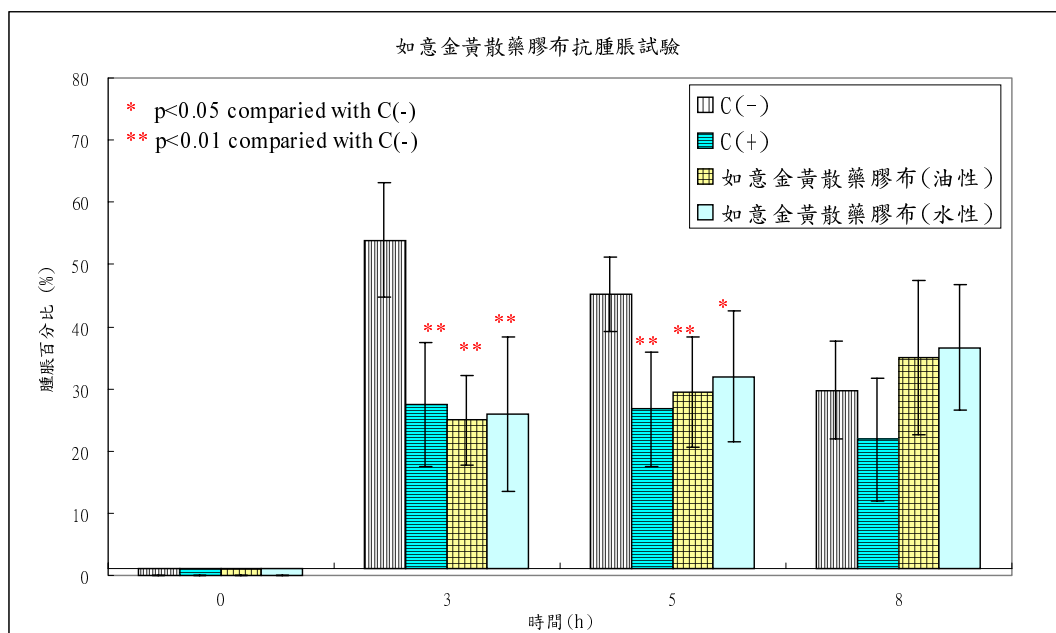
圖十五、 48 小時皮膚穿透後，如意金黃散油性藥貼之層析圖



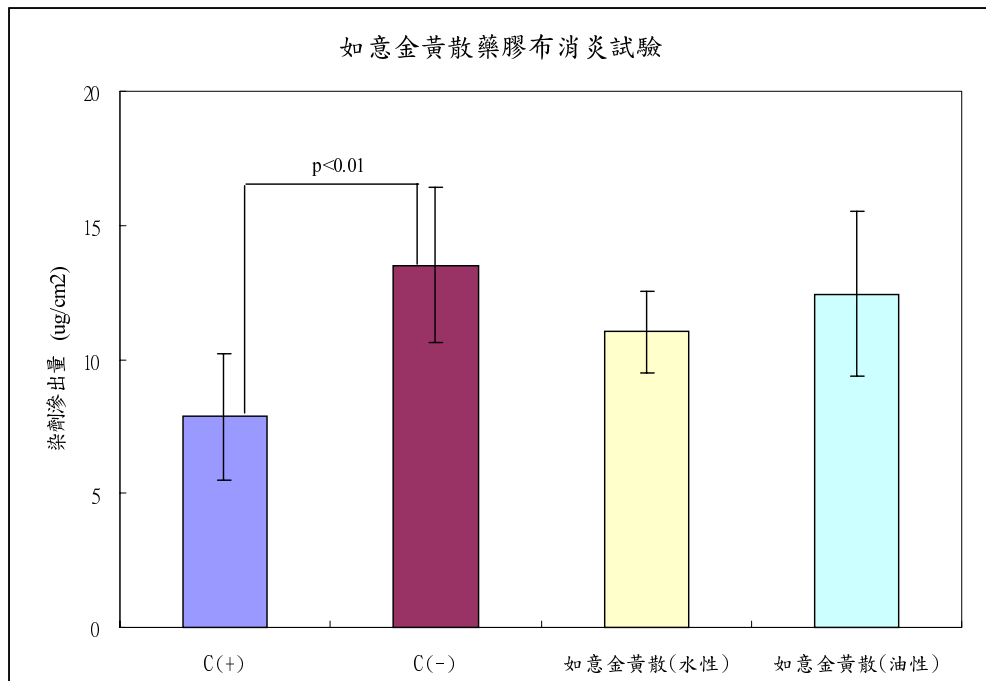
圖十六、 48 小時皮膚穿透後，如意金黃散水性藥貼之層析圖



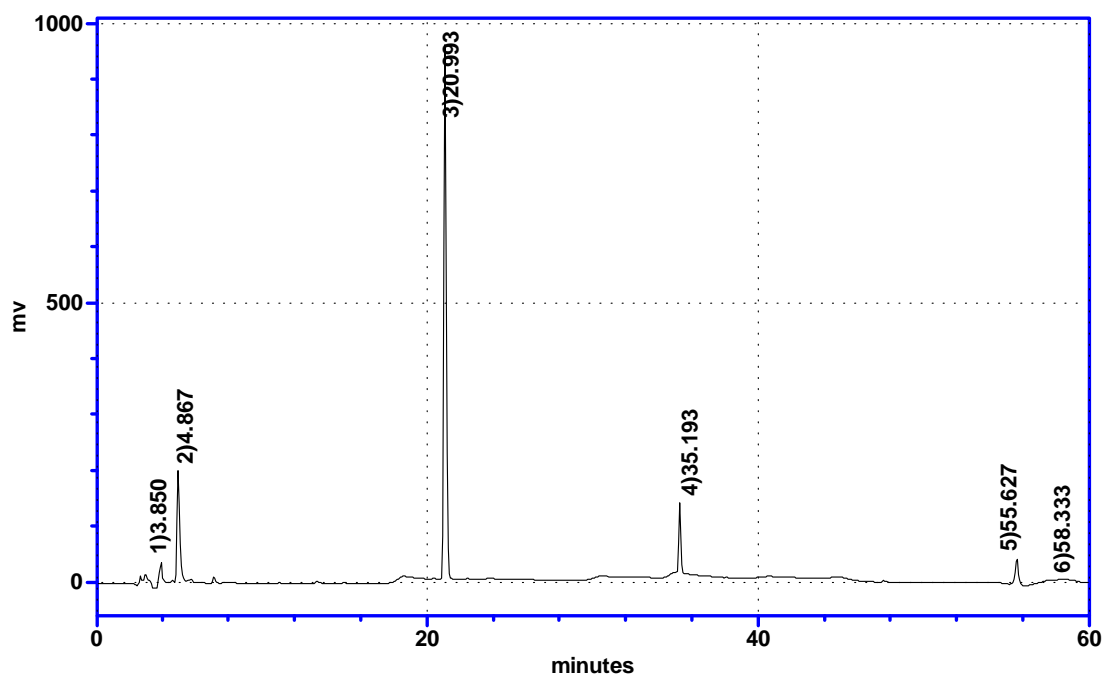
圖十七、如意金黃散藥膠布之止痛功效圖



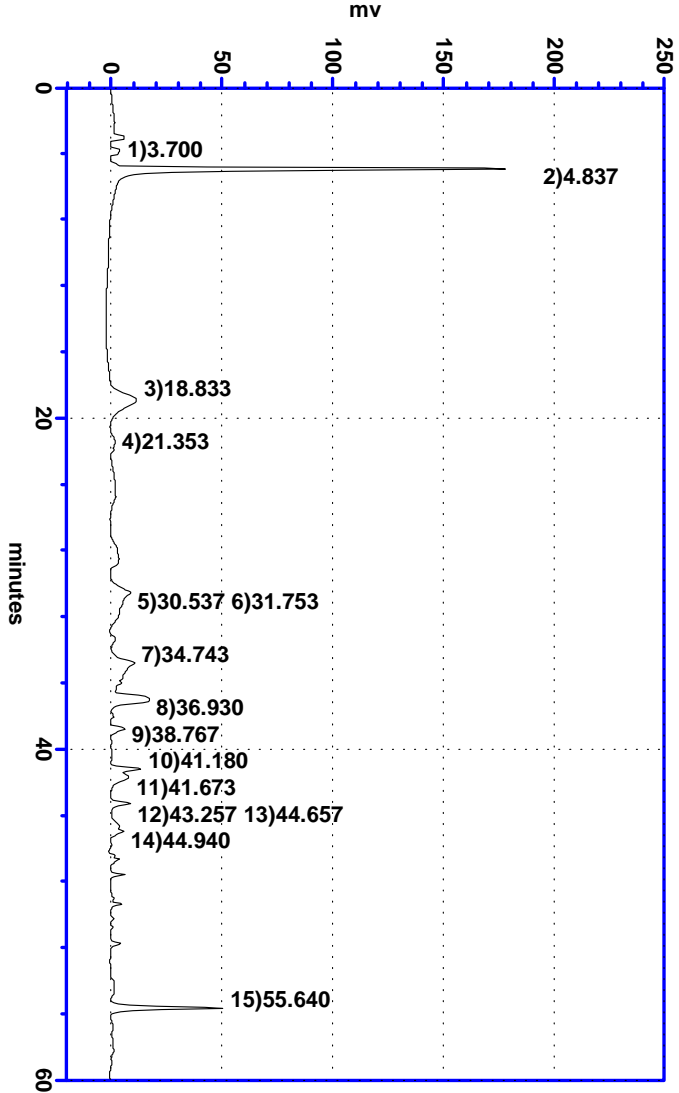
圖十八、如意金黃散藥膠布之抗腫脹功效圖



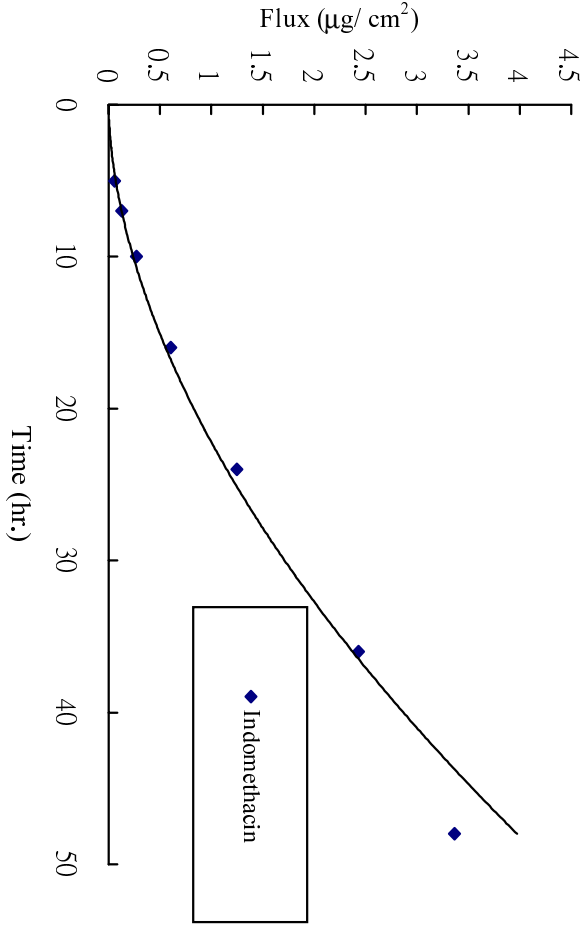
圖十九、如意金黃散藥膠布之消炎功效圖



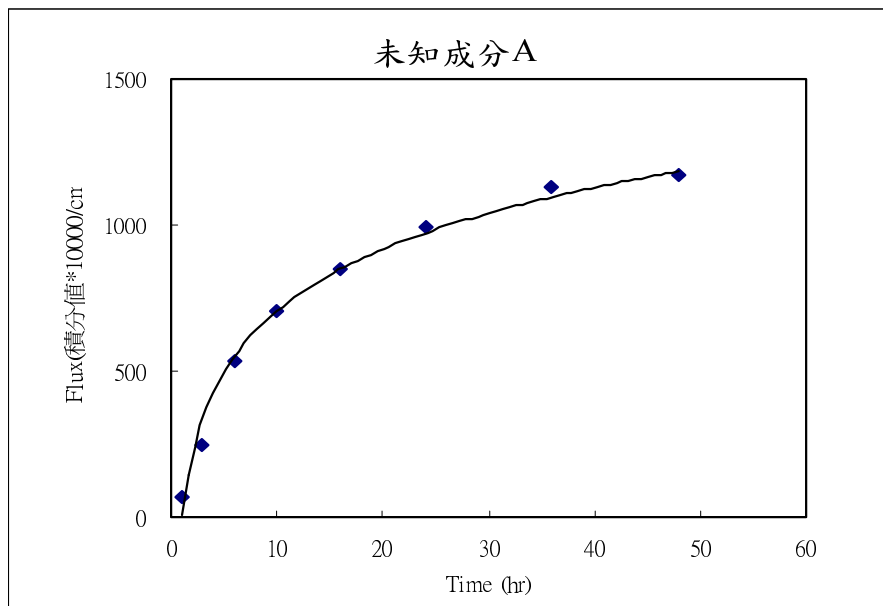
圖二十、如意金黃散水性藥貼 48 小時後之成分釋放層析圖



圖二十一、如意金黃散油性藥貼 48 小時後之成分釋放層析圖



圖二十二、正控制組 Indomethacin 藥膠布之穿透曲線圖



圖二十三、如意金黃散藥膠布未知成分 A 之穿透曲線圖

表一、如意金黃散指標成分之 HPLC 分析法精密度

如意金黃膏	Concentration	Mean±S.D.(C.V.%)	
	$\mu\text{g/mL}$	Intraday	Interday
Hesperidin	1	1.14±0.03(2.68)	1.14±0.03(2.68)
	5	5.05±0.06(1.23)	5.05±0.06(1.23)
	10	10.05±0.04(0.70)	10.04±0.07(0.66)
Sennoside A	1	1.09±0.01(1.00)	1.08±0.04(3.83)
	5	4.98±0.03(0.56)	4.99±0.06(1.24)
	10	9.96±0.02(0.22)	10.01±0.04(0.44)
Sennoside B	1	1.11±0.04(3.76)	1.11±0.06(5.22)
	5	4.99±0.03(0.64)	4.99±0.06(1.24)
	10	9.96±0.03(0.28)	9.96±0.04(0.41)
Glycyrrhizin acid	1	1.23±0.03(2.12)	1.23±0.03(2.84)
	5	5.18±0.11(1.47)	5.18±0.07(1.39)
	10	10.52±0.03(0.75)	10.52±0.20(1.90)
Curcumin	1	1.10±0.02(1.27)	1.10±0.02(2.13)
	5	4.97±0.05(0.69)	4.97±0.03(0.62)
	10	10.00±0.06(0.66)	10.00±0.09(0.89)
Imperatorin	1	1.06±0.02(1.33)	1.06±0.02(2.32)
	5	5.07±0.05(1.00)	5.07±0.05(0.95)
	10	10.02±0.03(0.23)	10.09±0.16(1.58)
Emodin	1	1.09±0.01(1.01)	1.09±0.01(1.01)
	5	5.05±0.09(1.74)	5.05±0.10(1.99)
	10	10.05±0.05(0.46)	10.05±0.05(0.46)
Magnonal	1	0.96±0.02(1.50)	0.96±0.01(1.48)
	5	5.21±0.28(5.34)	5.21±0.27(5.17)
	10	10.12±0.22(2.17)	10.12±0.39(3.85)

^a n=3, Repeat injection three times on the same day.^b n=3, Repeat injection three times each day and a successive three-day.

編號：CCMP91-RD-115 & CCMP92-RD-111

中藥藥膠布及藥酒製劑之成分分析及其釋出效應之研究（3-2&3）-中藥藥膠布的藥效動物實驗

陳福安

大仁技術學院

摘 要

本連續計劃目的在建立一套藥膠布的皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物評估模式並進行萬應膏、綠云膏及如意金黃散藥膠布之藥效試驗。以 Franz cell 裝置進行藥膠布皮膚穿透試驗，並以 HPLC 方法檢測萬應膏 11 種、綠云膏 8 種及如意金黃散 8 種指標成分之皮膚穿透。48 小時後檢出的成分為：萬應膏-油性藥膠布有 Cinnamic acid、Ferulic acid 及 5 種不明成分；萬應膏-水性（1g）藥膠布有 Cinnamic acid、Sennoside B 及 5 種不明成分；萬應膏-水性（300 mg）藥膠布有 Cinnamic acid、Sennoside B 及 4 種不明成分。綠云膏-水性藥膠布有 Baicalin 及 5 種不明成分；綠云膏-油性藥膠布則僅有 1 種不明成分。如意金黃散-油性與水性藥膠布均未發現已知指標成分之皮膚穿透，然發現一些不明成分之皮膚穿透。以 Writhing 試驗進行藥膠布止痛藥效評估，結果發現萬應膏-油性藥膠布、萬應膏-水性（1g）藥膠布、萬應膏-水性（300 mg）藥膠布及綠云膏-水性藥膠布具有顯著止痛作用，其效果依序為萬應膏-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 ≈ 萬應膏-水性（1g）藥膠布 > 萬應膏-水性（300 mg）藥膠布 > 綠云膏-水性藥膠布。如意金黃散-油性及水性藥膠布均具有顯著的差異，依止痛效果大小依序為如意金黃散-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 ≈ 如意金黃散-水性藥膠布。在抗腫脹效果方面，以腫脹測定儀測定藥膠布舒緩 Carrageenan 引起足蹠腫脹之能力，結果發現綠云膏-油性藥膠布與綠云膏-水性藥膠布有顯著抗腫脹作用，其效果依序為綠云膏-水性藥膠布 ≈ 市售 Indomethacin 藥膠布 > 綠云膏-油性藥膠布。如意金黃散油性與水性藥膠布均有

顯著抗腫脹藥效，與市售 Indomethacin 藥膠布效果相當。在消炎藥效試驗，測定藥膠布抑制組織胺引起 Pontamine sky blue 染劑滲出之能力，結果發現僅以萬應膏-水性（1g）藥膠布有顯著的抑制組織胺引起之染劑滲出，其消炎效果與市售 Indomethacin 藥膠布相當。

關鍵詞：藥膠布、皮膚穿透、藥效、止痛、抗腫脹、消炎

CCMP91-RD-115 & CCMP92-RD-111

Studies on the component analysis and the effect of release of marker components in plaster formulas and tonic wine formulas.

(3-2 & 3) - The animal experiment for efficacy of plaster formulas.

Fu-An Chen

Tajen Institute of Technology

ABSTRACT

The objective of this project is to establish a set animal model to evaluate skin penetration, anti-edematous, anti-inflammatory and analgesic activities of plasters and further estimate the efficacies of prepared Wan-in-gao, Liu-un-n-gao and Ru-I-kin-huang-san plasters. Franz cell apparatus was used to evaluate the skin penetration of plasters. The skin penetration of 11 marker components of Wan-in-gao plaster, 8 marker components of Liu-un-n-gao plaster and 8 marker components of Ru-I-kin-huang-san were monitored by HPLC methods. After 48 hours, the detectable components were cinnamic acid, ferulic acid and 5 unknown components for Wan-in-gao oily plaster ; cinnamic acid, sennoside B and 5 unknown components for Wan-in-gao aqueous (1g) plaster ; cinnamic acid, sennoside B and 4 unknown components for Wan-in-gao aqueous (300mg) plaster ; baicalin and 5 unknown components for Liu-un-n-gao aqueous plasters ; only 1 unknown component for Liu-un-n-gao oily plasters ; a number of unknown components for Ru-I-kin-huang-san oily and aqueous plasters. The writhing test was used to determine the analgesic activity of plasters. The results revealed that Wan-in-gao oily plaster, Wan-in-gao aqueous (1g) plaster, Wan-in-gao aqueous (300mg) plaster and Liu-un-n-gao aqueous plaster possessed significant analgesic

activity. The analgesic efficacy is in the order of Wan-in-gao oily plaster > Indomethacin plaster \approx Wan-in-gao aqueous (1g) plaster > Wan-in-gao aqueous (300mg) plaster > Liu-un-n-gao aqueous plaster. Both Ru-I-kin-huang-san oily and aqueous plasters possessed significant analgesic activity. The analgesic efficacy is in the order of Ru-I-kin-huang-san oily plaster > Indomethacin plaster \approx Ru-I-kin-huang-san aqueous plaster. Plethysmometer apparatus is applied to evaluate the anti-edematous activities against carrageenan-induced paw edema. The results found that Liu-un-n-gao aqueous plaster and Liu-un-n-gao oily plasters had significant anti-edematous activity. The efficacy is in the order of Liu-un-n-gao aqueous plaster \approx Indomethacin plaster > Liu-un-n-gao oily plaster. Both Ru-I-kin-huang-san oily and aqueous plasters had significant anti-edematous activity. Their efficacies are similar to that of Indomethacin plaster. Analysis of the dye leakage is employed to examine the anti-inflammatory efficacy of rats confronted with histamine-induced capillary permeability. The results found that only Wan-in-gao aqueous (1g) plaster possessed significant anti-inflammatory activity similar to efficacy of Indomethacin plaster.

Keywords: Plaster , Skin penetration, Efficacy, analgesic activity, anti-inflammation, anti-edema

壹、前言

中國醫藥自有文字記載以來已有數千年的悠久歷史，它融合中國歷代祖先長期與疾病對抗奮鬥的豐富經驗，具有悠久之臨床經驗。中草藥有數千至萬種動植與礦物藥物，其研究題材相當豐富，在加上西方醫藥面臨一些開發瓶頸，使得現代醫藥之設計靈感與製藥技術逐漸取材中草藥，以致中草藥成為國內外具前瞻性之一門科學。我國本著具有豐富資源及歷史悠久的中醫藥使用經驗之優厚條件，製藥工業和生物科技被公認為 21 世紀最具有發展潛力的產業，其具有市場潛力大、附加價值高、技術層次高污染程度低的特性，非常適合在台灣發展，因此行政院在民國 84 年即頒訂「加強生物技術產業推動方案」，其中中草藥已被列為重點推動項目之一。又行政院八十九年五月所召開第四次生物技術產業策略（SRB）會議，已達成共識，將以國家型計畫來發展中草藥，經濟部所報「中草藥產業技術發展五件計畫」也經行政院同意在案，經濟部所屬的生醫中心、生技中心及藥技中心也將依特定項目，進行相關的研究。另外，衛生署中醫藥委員會也致力將中草藥研發創造，成為台灣電子榮景之重現，將中草藥研究發展與現代生化科技結合，提昇台灣成為中草藥科技島，並將健康食品、特殊療效之方劑、中藥化妝品、藥酒及貼布等，列為重點發展品項。藥膠布有效成分及其釋出情形之探討更被列為今後三年度之重點研究項目。

藥膠布（貼布、膏藥）在國內為佔有相當大市場之一種外用製劑，一般用於用於消腫、消炎及止痛等之醫療用途上。外用製劑一般分有局部性、區域性及系統性經皮吸收製劑¹，而藥膠布大致屬局部性及區域性外用製劑，不管是局部性、區域性及系統性作用製劑，均要經皮吸收以產生療效。外用製劑有較少之副作用及免於口服製劑受肝臟之 First-pass 效應與胃腸破壞成份之優點，一般被認為理想之劑型²。目前藥膠布之傳統製法係以麻油或香油與藥材浸泡後，再加熱、熬煮、抽取，再將抽取物與橡膠、樹脂類物質混合均勻，塗於適宜的裱被材料上。但在藥膠布之製程中，對麻油抽取之條件；成分的安定性；成分之分析；藥膠布之安全性（皮膚刺激性）；藥膠布中成份的皮膚穿透；及其藥效如消腫、消炎及止痛評估，皆無一可行性檢驗與評估標準。因此建立一套包含前述項目之完整藥膠布品質評估標準依據是當前的重要課題。藥膠布除成份含量分析控管外，其藥效則是最終製劑展現之結果，亦為消費者最關心之訊息。因藥膠布為外用製劑故其成份的皮膚穿透直接影響其製劑的藥效。又觀目前國內在中藥藥膠布成份的皮膚穿透及藥效如止痛、消腫與消炎評估仍尚待建立。為求完整性，本子計畫將配合研究重點項目『探討藥膠布中有效成份及其釋出情形之研究』群體計畫建立藥膠布成份的皮膚穿透及藥效評估動物模式以對所製備成的油性及水性藥膠布進行成份皮膚穿透及止痛、消腫與消炎藥效

評估，以確保藥膠布製劑品質與有效性，而達到品質管制的目的。

本計劃屬連續計劃，91 年度完成萬應膏及綠云膏油性及水性藥膠布的成份皮膚穿透及止痛、消腫與消炎藥效評估。92 年度繼續完成評估其他子計畫所製備之如意金黃散油性及水性藥膠布的成份皮膚穿透及止痛、消腫與消炎藥效。所得結果將可作為藥廠及相關單位之在藥膠布皮膚穿透及其藥效評估上之依據與參考。

貳、材料與方法

2.1 試藥與材料

Glacial acetic acid【Merck, Germany】、Pyridine【Fisher, USA】、Acetonitrile【Fisher, USA】、DDW、sodium azide【Ferak, Germany】、carrageenan lambda【Sigma, USA】、Berberine hydrochloride【Nacalai tesque, Japan】、Aconitine (95%)【Sigma, USA】、Ferulic acid【Sigma, USA】、Glycyrrhizic acid【Nacalai tesque, Japan】、Harpagoside【Extrasynthese, France】、Paeoniflorin (98%)【Nacalai tesque, Japan】、Sennoside A【Extrasynthese, France】、Sennoside B【Extrasynthese, France】、Emodin (90%)【Sigma, USA】、Trans-cinnamaldehyde【Nacalai tesque, Japan】、Trans-cinnamic acid (98.5%)【Nacalai tesque, Japan】、Coptisine(98%)【Nacalai tesque, Japan】、Baicalin(98%)【Nacalai tesque, Japan】、Palmatine chloride【Sigma, USA】、Hesperidin【Sigma, USA】、Curcumin【Sigma, USA】、Imperatorin【Extrasynthese, France】、Magnolol【Nacalai tesque, Japan】及 Indomethacin【Sigma, USA】。

每片萬應膏 (1g) 藥膠布 (14 × 10.3 cm) 含有川烏及草烏、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、大黃與木鱉子(去殼)等藥材各 1g 所抽出之萃取物。

每片萬應膏 (300mg) 藥膠布 (14 × 10.3 cm) 含有川烏及草烏、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、大黃與木鱉子(去殼)等藥材各 (300mg) 所抽出之萃取物。

每片綠云膏藥膠布 (14 × 10.3 cm) 含有黃連、黃柏、黃芩、大黃與玄參等藥材各 300 mg 所抽出之萃取物。

每片如意金黃散藥膠布 (14×10.3 cm) 藥材含量相當於栝樓根 500mg、黃柏、大黃、薑黃、白芷 250 mg、厚朴、陳皮、甘草、蒼朮、生天南星 100 mg 所抽出之萃取物。

愛斯貼布 (正控制組, 衛署藥輸字第 023119 號): 每公克含 Indomethacin 3.75 mg, 每一貼布 (14cm×10cm, 14 g) 中含有 52 mg 的 Indomethacin, 即每 cm² 貼布含有 Indomethacin 0.37 mg。

2.2 HPLC 儀器

HPLC 儀器: 系統泵浦【Shimadzu, LC-10AT, Japan】、UV 檢測儀【Shimadzu, SPD-10A, Japan】、積分系統【訊華數據處理系統】、自動注入器【Jasco, Japan】、脫氣裝置【Gastorr】。

2.3 萬應膏 11 種指標成分之 HPLC 分析條件

本方法針對萬應膏中 Aconitine (川烏及草烏)、Cinnamaldehyde、Cinnamic acid (肉桂)、Ferulic acid (當歸)、Paeoniflorin (赤芍藥)、Glycyrrhizic acid (甘草)、Osthol (獨活)、Harpagoside (元參)、Emodin、Sennoside A、Sennoside B (大黃) 11 種指標成分所建立之 HPLC 分析方法, 其條件為: 管柱【Cosmosil 5C18-AR-II 5 μm 250 × 4.6 mm, Japan】、UV 檢測波長為 250 nm、感度範圍為 0.02 AUFs、樣本液分析量 100 μL。梯度沖提 (gradient elution)、流速為 1.0 mL/min。梯度程式: (A 溶液為 1 % glacial acetic acid、B 溶液為 acetonitrile)

Time	A(%)	B(%)
0-12 minutes	83	17
12-24 minutes	70	30
24-29 minutes	60	40
29-39 minutes	40	60
39-50 minutes	20	80
50-60 minutes	83	17

2.4 綠雲膏 8 種指標成分之 HPLC 分析條件 (有兩種分析法)

綠雲膏中 Coptisine、Berberine (黃連)、Palmatine (黃柏)、Baicalin (黃芩)、Emodin、Sennoside A、Sennoside B (大黃) 與 Harpagoside (玄參) 8 種指標成分所建立之 HPLC 分析方法有兩種。第一種適用於 Baicalin、Emodin、Sennoside A、Sennoside B 及 Harpagoside 的分析, 其條件為: 管柱【Cosmosil 5C18-AR-II 5 μm 250 × 4.6 mm, Japan】、UV 檢測波長為 250 nm、感度範圍為 0.02

AUFs、樣本液分析量 100 μ L。梯度沖提、流速為 1.0 mL/min。梯度程式：(A 溶液為 1 % glacial acetic acid、B 溶液為 acetonitrile)

Time	A(%)	B(%)
0-10 minutes	75	25
10-17 minutes	70	30
17-22 minutes	40	60
22-35 minutes	40	60
35-45 minutes	85	15

第二種適用於 Berberine、Palmatine 及 Coptisine 的分析，其條件為：管柱【Cosmosil 5C 18-AR-II 5 μ m 250 \times 4.6 mm, Japan】、UV 檢測波長為 265 nm、感度範圍為 0.02 AUFs、樣本液分析量 100 μ L。等位沖提、流速為 1.5 mL/min。A 溶液為 acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (含 5mM SDS) = 40 : 60；B 溶液為 acetonitrile : methanol : water = 45 : 45 : 10。移動相即 A 溶液 : B 溶液 = 65 : 35。

2.5 如意金黃散 8 種指標成分之 HPLC 分析條件

本方法針對如意金黃散中 Sennoside A、Sennoside B、Emodin (大黃)、Curcumin (薑黃)、Imperatorin (白芷)、Magnolol (厚朴)、Hesperidin (陳皮)、Glycyrrhizin (甘草) 8 種指標成分所建立之 HPLC 分析方法其條件為：管柱【Cosmosil 5C18-MS-II, 5 μ m 250 \times 4.6 mm, Japan】、UV 檢測波長為 250 nm、感度範圍為 0.02 AUFs、樣本液分析量 100 μ L。梯度沖提 (gradient elution)、流速為 1.0 mL/min。梯度程式：(A 溶液為 1 % glacial acetic acid、B 溶液為 acetonitrile)

Time	A(%)	B(%)
0-12 minutes	83	17
12-24 minutes	70	30
24-29 minutes	60	40
29-39 minutes	40	60
39-50 minutes	20	80
50-60 minutes	83	17

2.4 皮膚穿透性動物試驗³⁻⁴

試驗動物為 ICR 小白鼠 (公；7 週齡；23-32 g)。試驗期間，飼料飲水均採任食。試驗共分為六組，分別為萬應膏油性、萬應膏水性、綠云膏油性、綠云膏油性藥膠布、如意金黃散油性及如意金黃散水性藥膠布。小白鼠先行頸椎斷離犧牲 (圖一)，再以電動剃毛器剃除腹部毛髮，取下腹部皮膚 (圖二)。取

下的皮膚，內部以生理食鹽水濕潤後，夾在 Franz cell 滲透裝置的 Donor cell 與 Receptor cell 間，同時將藥膠布 (2×2 cm) 則置於皮膚上方 (圖三)。Receptor cell 充滿生理鹽水 (含 0.03 % sodium azide) 於 32°C 恆溫與 500 rpm 固定速度攪拌下進行皮膚的穿透試驗，並於不同時間點採樣，將樣本注入 HPLC 中進行分析藥膠布指標成分之皮膚穿透情形。

2.5 止痛藥效動物試驗⁵

試驗動動為 ICR 小白鼠 (公；7 週齡；24-33 g)。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 (市售 Indomethacin 藥膠布) 及實驗組 (萬應膏、綠云膏及如意金黃散的油性與水性藥膠布)，每組 6 隻。

小白鼠稱重編號，然四肢固定於平板並進行腹部剃毛後，將藥膠布 (2×3 cm) 貼於小白鼠的腹部上 (圖四)。3 小時後去除藥膠布，以 0.6 % 醋酸溶液行腹腔注射 (i.p., 20 mL/kg)。觀察 10 分鐘內，小白鼠的 Writhing 次數 (圖五)。

2.6 抗腫脹藥效動物試驗⁶⁻⁷

試驗動動為 Wistar 大白鼠 (公；6-8 週齡；120~218 g)。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 (市售 Indomethacin 藥膠布) 及實驗組 (萬應膏、綠云膏及如意金黃散的油性與水性藥膠布)，每組 6 隻。

將大白鼠稱重編號，並於大白鼠的兩足蹠以簽字筆，劃一「測量線」(圖六)。以腫脹測定儀 (Plethysmometer；腫脹測定液：2 ml 腫脹液加入 180 ml 之 0.065 % NaCl in H₂O)，先測量其兩足蹠之體積 (圖七)。先穿自製 (不同規格) 束腹彈性繃帶以避免老鼠咬掉藥膠布 (圖八)。貼藥膠布 (2×3 cm) 於兩足蹠，並以 3M 透氣膠帶固定 (圖九)。1 小時後，皮內注射 0.1mL 的 Carrageenan (10 mg/mL in saline) 於兩足蹠，再貼新的藥膠布於兩足蹠，再以腫脹測定儀測量 3 小時後之腫脹百分比。

$$\text{腫脹百分比(\%)} = \frac{(\text{注射後 3 小時的腫脹後體積} - \text{注射後 0 小時的腫脹後體積})}{\text{注射後 0 小時的腫脹後體積}} \times 100$$

2.7 消炎藥效動物試驗⁸

試驗動物為 Wistar 大白鼠（公；6-8 週齡；120-235 g）。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（市售 Indomethacin 藥膠布）及實驗組（萬應膏、綠云膏及如意金黃散的油性與水性藥膠布），每組 6 隻。

將大白鼠稱重編號，行腹部剃毛後，取藥膠布（4×4 cm）貼於腹部上並以 3M 透氣膠帶先固定（圖十），後穿自製（不同規格）束腹彈性繃帶以避免老鼠咬掉藥膠布。3 小時後去除藥膠布，並以簽字筆畫 2×2 cm 面積後，自尾靜脈注射 Pontamine sky blue 6BX 溶液（4 % 溶在無菌水；2.5 mL/kg B.W.）（圖十一）。3 分鐘後，腹部行皮內注射 0.05 mL Histamine（0.33 % in saline）（圖十二）。30 分鐘後犧牲大白鼠，將注有 Histamine 處之皮膚（2×2 cm）取下（圖十三）。經細切後置於離心管（25 mL）內，再加入 3 mL Trichloroacetic acid 溶液（5 % in H₂O）。18 小時後置於研鉢內研磨，研磨後的泥狀物再以適量的 5 % Trichloroacetic acid 溶液洗出，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）震盪萃取 40 分鐘（150 次/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，經試管震盪器震盪 1 分鐘後離心。以 Spectrophotometer 測定“上層液”（Pyridine 層）之 600 nm 吸光度。

2.9 如意金黃散藥膠布中成分之釋放試驗

試驗共分為二組，分別為如意金黃散油性及水性藥膠布。取透析膜（0.45μm, Gelman, USA）後，夾在 Franz cell 滲透裝置的 Donor cell 與 Receptor cell 間，同時將藥膠布（2×2 cm）則置於皮膚上方。Receptor cell 充滿生理鹽水（含 0.03 % sodium azide）於 32℃ 恆溫與 500 rpm 固定速度攪拌下進行成分釋放試驗，並於 48 小時後，將樣本注入 HPLC 中進行分析藥膠布成分釋放情形。

2.10 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。

參、結果

3.1 指標成分皮膚穿透性動物試驗

3.1.1 萬應膏藥膠布指標成分皮膚穿透性動物試驗

本試驗以 HPLC 進行檢測的指標成分共 11 種(如圖十四)，分別於 HPLC 上最低檢測極限 ($S/N > 3$) 為 Aconitine ($2.5\mu\text{g/mL}$)、Cinnamaldehyde ($0.05\mu\text{g/mL}$)、Cinnamic acid ($0.025\mu\text{g/mL}$)、Ferulic acid ($0.1\mu\text{g/mL}$)、Paeoniflorin ($0.1\mu\text{g/mL}$)、Glycyrrhizic acid ($1\mu\text{g/mL}$)、Osthol ($0.025\mu\text{g/mL}$)、Harpagoside ($0.025\mu\text{g/mL}$)、Emodin ($0.01\mu\text{g/mL}$)、Sennoside A ($0.02\mu\text{g/mL}$) 及 Sennoside B ($0.1\mu\text{g/mL}$)。

由 48 小時的皮膚穿透 HPLC 層析圖得知，在萬應膏-油性藥膠布方面，可測到已知成分有 2 種(即 Cinnamic acid 及 Ferulic acid) 及 5 種未知成分(如圖十五)。在萬應膏-水性藥膠布方面，可測到已知成分有 2 種(即 Cinnamic acid 及 Sennoside B) 及 5 種未知成分(如圖十六)，而未知成分中有 4 種與油性藥膠布相同。就已知成分 Cinnamic acid、Ferulic acid 與 Sennoside B 進行 HPLC 上之精密度 (precision) 分析，結果如表一所示，其日間與日內變動均合乎要求，進一步進行穿透成分滲透量之測定。

萬應膏-油性藥膠布已知成分穿透曲線圖如圖十七所示，Cinnamic acid 於穿透後 1 小時即可檢測到 $0.77\mu\text{g/cm}^2$ ，48 小時後達 $11.95\mu\text{g/cm}^2$ ；Ferulic acid 則是在 16 小時後檢測到 $0.98\mu\text{g/cm}^2$ ，48 小時後達 $2.34\mu\text{g/cm}^2$ 。萬應膏-水性 (1g) 藥膠布已知成分之穿透曲線圖如圖十八所示，Cinnamic acid 於穿透後 1 小時即可檢測到 $0.43\mu\text{g/cm}^2$ ，48 小時後達 $4.45\mu\text{g/cm}^2$ ；Sennoside B 則是在 26 小時後檢測到 $1.36\mu\text{g/cm}^2$ ，48 小時後達 $2.32\mu\text{g/cm}^2$ 。另在萬應膏-水性 (300 mg) 藥膠布成分穿透方面，由其 HPLC 層析圖(圖十九)可發現已知成分有 2 種(即 Cinnamic acid 及 Sennoside B) 及未知成分有 4 種，HPLC 圖與萬應膏水性藥膠布 (1g) 相仿。就萬應膏-水性 (300 mg) 藥膠布已知成分穿透量方面，其穿透曲線圖如圖二十所示，Cinnamic acid 於穿透後 5 小時即可檢測到 $0.29\mu\text{g/cm}^2$ ，48 小時後達 $0.81\mu\text{g/cm}^2$ ；Sennoside B 則是在 24 小時後檢測到 $0.98\mu\text{g/cm}^2$ ，48 小時後達 $1.79\mu\text{g/cm}^2$ 。在成份穿透量上萬應膏-水性 (1g) 藥膠布比萬應膏-水性 (300 mg) 藥膠布高，有劑量依存關係。

3.1.2 綠雲膏藥膠布指標成分皮膚穿透性動物試驗

本試驗以兩種 HPLC 進行檢測綠雲膏的指標成分共 8 種(如圖二十一與圖

二十二)。其 HPLC 上最低檢測極限 ($S/N > 3$) 分別為 Baicalin ($0.5\mu\text{g/mL}$)、Emodin ($0.01\mu\text{g/mL}$)、Sennoside A ($0.05\mu\text{g/mL}$)、Sennoside B ($0.05\mu\text{g/mL}$)、Harpagoside ($0.025\mu\text{g/mL}$)、Coptisine ($0.1\mu\text{g/mL}$)、Berberine ($0.05\mu\text{g/mL}$)、及 Palmatine ($0.1\mu\text{g/mL}$)。

由 48 小時的皮膚穿透 HPLC 層析圖得知，在綠云膏-水性藥膠布方面，可測到已知成分僅有 1 種 (即 Baicalin) 及未知成分有 5 種 (如圖二十三)。在綠云膏-油性藥膠布方面，僅有 1 種未知成分 (7.1 min) 於穿透 48 小時後 (如圖二十四)，少量地被檢測出。就已知成分 Baicalin 進行 HPLC 上之精密度評估，結果如表二所示，其日間與日內變動均合乎要求，進一步進行穿透成分穿透量之測定。就綠云膏-水性藥膠布已知成分之穿透量方面，其穿透曲線圖如圖二十五所示，Baicalin 於穿透後 16 小時即可檢測到 $5.05\mu\text{g/cm}^2$ ，48 小時後達 $5.56\mu\text{g/cm}^2$ 。

3.1.3 如意金黃散藥膠布指標成分皮膚穿透性動物試驗

本試驗以 HPLC 進行檢測的指標成分共 8 種 (如圖二十六)，其 HPLC 上最低檢測極限 ($S/N > 3$) 分別為 Sennoside A ($0.05\mu\text{g/mL}$)、Sennoside B ($0.05\mu\text{g/mL}$)、Emodin ($0.03\mu\text{g/mL}$)、Hesperidin ($0.1\mu\text{g/mL}$)、Curcumin ($0.05\mu\text{g/mL}$)、Imperatorin ($0.05\mu\text{g/mL}$)、Magnonol ($0.05\mu\text{g/mL}$) 及 Glycyrrhizin ($0.5\mu\text{g/mL}$)。

8 種指標成分之檢量線 Sennoside A ($0.0625 \sim 5\mu\text{g/mL}$)、Sennoside B ($0.0625 \sim 5\mu\text{g/mL}$)、Emodin ($0.0625 \sim 5\mu\text{g/mL}$)、Hesperidin ($0.25 \sim 10\mu\text{g/mL}$)、Curcumin ($0.0625 \sim 5\mu\text{g/mL}$)、Imperatorin ($0.0625 \sim 5\mu\text{g/mL}$)、Magnonol ($0.0625 \sim 5\mu\text{g/mL}$) 及 Glycyrrhizin ($0.5 \sim 10\mu\text{g/mL}$) 的相關係數 (r^2) 均大於 0.995。8 種指標成分之精密度 (precision) 分析結果如表四所示，其日內 ($C.V. = 0.22 \sim 5.34\%$) 與日間 ($C.V. = 0.41 \sim 5.17\%$) 變動均合乎要求，進一步進行穿透成分滲透量之測定。

48 小時的如意金黃散-油性與水性藥膠布皮膚穿透 HPLC 層析圖如圖二十七及二十八所示，結果發現均未發現此 8 種指標成分之皮膚穿透 (經屏科大賴教授之 HPLC 方法確認亦得相同結果)，然發現有其他不明成分之皮膚穿透。在如意金黃散-油性藥膠布方面，至少有 4 種以上不明成分，而如意金黃散-水性藥膠布方面，穿透不明成分較多，至少有 6 種不明成分。

3.1.4 市售 Indomethacin 藥膠布皮膚穿透性動物試驗

Indomethacin 之 HPLC 層析圖如圖二十九所示，其最低檢測極限 ($S/N > 3$)

為 $0.01\mu\text{g/mL}$ 。市售 Indomethacin 藥膠布經 48 小時穿透 HPLC 圖（圖三十）可發現 Indomethacin 之皮膚穿透。就 Indomethacin 進行 HPLC 之精密度評估，結果如表三所示，其日間與日內變動均合乎要求，進一步進行 Indomethacin 穿透量之測定，其穿透曲線圖如圖三十一所示，Indomethacin 於穿透後 5 小時即可檢測到 $0.058\mu\text{g/cm}^2$ ，48 小時後達 $3.366\mu\text{g/cm}^2$ 。此外，亦發現 Indomethacin 藥膠布成份穿透曲線圖與萬應膏及綠雲膏藥膠布有很大之差異，因此得知 Indomethacin 藥膠布之成分穿透機轉與萬應膏及綠雲膏藥膠布之成分穿透機轉不同，因此穿透機轉與穿透成分種類及藥膠布基劑有關。

3.2 止痛藥效動物試驗

將藥膠布（ $2\times 3\text{ cm}$ ）貼於小白鼠的腹部（已剃毛）上，3 小時後去除藥膠布，腹腔注射 0.6 %醋酸溶液後，觀察小白鼠的 writhing 次數以評估藥膠布之止痛效果。

萬應膏與綠雲膏油性與水性藥膠布止痛結果如圖三十二所示，在實驗組當中萬應膏-油性、萬應膏-水性（1g）、萬應膏-水性（300 mg）及綠雲膏-水性具有極顯著的差異（ $p<0.01$ ），其中萬應膏-水性（1g）比萬應膏-水性（300 mg）藥效好，與皮膚穿透量有相關性，有劑量依存關係。而綠雲膏-水性藥膠布亦具顯著的差異（ $p<0.05$ ）。其效果依序為萬應膏-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 \approx 萬應膏-水性（1g）藥膠布 > 萬應膏-水性（300 mg）藥膠布 > 綠雲膏-水性藥膠布。

如意金黃散-油性及水性藥膠布止痛結果如圖三十三所示，結果顯示，實驗組如意金黃散-油性及水性藥膠布與負控制組均具有顯著的差異（ $p<0.01$ ），其中如意金黃散-油性比如如意金黃散-水性藥效好（ $p<0.05$ ）。依止痛效果大小依序為如意金黃散-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 \approx 如意金黃散-水性藥膠布。

3.3 抗腫脹藥效動物試驗

將藥膠布（ $2\times 3\text{ cm}$ ）貼於大白鼠兩足蹠上。1 小時後，皮內注射 0.1 mL 的 Carrageenan（10 mg/mL in saline）。注射後，繼續貼新藥膠布，3 小時後，測量其兩足蹠的腫脹，並評估其腫脹百分比（%）。

萬應膏與綠雲膏油性與水性藥膠布抗腫脹結果如圖三十四所示，就抑制腫脹結果顯示實驗組當中以綠雲膏-水性具較顯著的抗腫脹功效（ $p<0.01$ ），而綠雲膏-油性亦具有顯著的消腫功效（ $p<0.05$ ）。其效果依序為綠雲膏-水性藥膠布 \approx 市

售 Indomethacin 藥膠布 > 綠云膏-油性藥膠布。

如意金黃散-油性及水性藥膠布抗腫脹結果如圖三十五所示，在抑制腫脹結果顯示，3 小時後，實驗組如意金黃散-油性及水性藥膠布與負控制組均具有顯著的差異 ($p < 0.01$) 且與市售 Indomethacin 藥膠布之藥效相當。然繼續觀察 5~8 小時後之結果，發現正控制組之消腫曲線圖與實驗組有差異，正控制組在 3 小時時腫脹達最高點，之後則開始消腫，然實驗組在 1-3 小時腫脹較快，然 5-8 小時腫脹趨緩。

3.4 消炎藥效試驗

大白鼠行腹部剃毛後，取藥膠布 (4×4 cm) 貼於腹部上。3 小時後去除藥膠布，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，測定其每單位面積皮膚所滲出之 Pontamine sky blue 量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)。萬應膏與綠雲膏油性與水性藥膠布抑制染劑滲出結果如圖三十六所示，在實驗組當中僅以萬應膏-水性 (1g) 藥膠布具有顯著抑制染劑滲出功效 ($p < 0.05$)，其效果與市售 Indomethacin 藥膠布相當。

如意金黃散-油性及水性藥膠布抑制染劑滲出結果如圖三十七所示，在實驗組如意金黃散-水性與油性藥膠布均未發現有顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出 ($p > 0.05$) 之效果。比較如意金黃散-水性與油性藥膠布之染劑滲出量，水性似乎比油性少些，然未達統計之差異。

3.5 如意金黃散藥膠布中成分之釋放試驗

48 小時的如意金黃散-油性與水性藥膠布成分釋放 HPLC 層析圖如圖三十九及四十所示，結果發現如意金黃散-油性藥膠布之釋放成分種類數比如意金黃散-水性藥膠布多。

肆、討論

91-92 年連續計劃目的在建立一套藥膠布的皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物評估模式。在 91 年計畫完成萬應膏與綠雲膏油性與水性藥膠布之皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物試驗。92 年計畫完成如意金黃散藥膠布油性與水性之皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物試驗。

4.1 藥膠布皮膚穿透試驗

在萬應膏-油性藥膠布方面，可測到已知成分有 2 種（即 Cinnamic acid 及 Ferulic acid）及 5 種未知成分。在萬應膏-水性藥膠布方面，可測到已知成分有 2 種（即 Cinnamic acid 及 Sennoside B）及 5 種未知成分，而未知成分中有 4 種與油性藥膠布相同。在成份穿透量上萬應膏-水性（1g）藥膠布比萬應膏-水性（300 mg）藥膠布高，有劑量依存關係。在綠雲膏-水性藥膠布方面，可測到已知成分僅有 1 種（即 Baicalin）及未知成分有 5 種。在綠雲膏-油性藥膠布方面，僅有 1 種未知成分少量地被檢測出。在如意金黃散-油性與水性藥膠布方面，均未發現 8 種指標已知成分之皮膚穿透，然發現有其他不明成分之皮膚穿透。如意金黃散-油性藥膠布至少有 4 種以上不明成分，而如意金黃散-水性藥膠布穿透不明成分較多，至少有 6 種不明成分。

水性與油性藥膠布所含之藥材種類與量相同，但能穿透皮膚的成分種類與量差異很大，因此水性與油性不同基劑會決定藥膠布皮膚穿透的成分種類與穿透量，藥膠布的皮膚穿透試驗為基劑配方的最佳化設計之評估指標之一，可作為藥膠布品管上比對之依據。在萬應膏與綠雲膏皮膚穿透試驗只發現有少部分指標成份會穿透過皮膚，但含許多不明成分，因此指標成分不能代表有效成分，此外、中藥藥膠布所含中藥組成多其成分更是複雜，一般能穿透過的成分有理化特性上之限制要求，因此不同種藥膠布之中藥組成與基劑不同理應有不同之 HPLC 成分穿透圖，如萬應膏與綠雲膏油性與水性藥膠布有不同之 HPLC 成分穿透圖；萬應膏水性 1g 劑量與 300mg 劑量之成分穿透種類一樣，但釋出成份量較低，依此亦可作為藥膠布品管上比對之依據。

4.2 止痛藥效動物試驗

在止痛方面，91 年度結果顯示萬應膏-油性藥膠布、萬應膏-水性（1g）藥膠布、萬應膏-水性（300 mg）藥膠布及綠雲膏-水性藥膠布均有顯著止痛作用，其效果依序為萬應膏-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 ≈ 萬應膏-水性

(1g) 藥膠布 > 萬應膏-水性 (300 mg) 藥膠布 > 綠雲膏-水性藥膠布。觀萬應膏之止痛藥效，油性比水性效果好，此結果與分量上（以 Cinnamic acid、Ferulic acid、不明成分 3 & 4 為例）有相關性，因此止痛藥效可能與此些成分有關。觀綠雲膏之止痛藥效，僅水性有止痛藥效，此結果與穿透成分種類數與量上（以不明成分 1、3 & 4 為例）有相關性，因此止痛藥效可能與此些成分有關。92 年度結果顯示如意金黃散-油性及水性藥膠布均具有顯著止痛功效，其中如意金黃散-油性比如如意金黃散-水性藥膠布藥效好，與釋放成分之種類數有相關性。依止痛效果大小依序為如意金黃散-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 \approx 如意金黃散-水性藥膠布。基於皮膚角質屬親油特性，理論上會穿透皮膚之成分應屬親油性成分，在成分釋放試驗已發現油性藥膠布之成分釋放種類均比水性藥膠布多，並具有較佳之止痛藥效，然觀傳統如意金黃散以水攪拌後外敷理論上可能使親油性成分較難釋放以致藥效不佳，因此以水攪拌後外敷之傳統使用法可能較不恰當。

在止痛效果方面以萬應膏-油性、萬應膏-水性、萬應膏-水性 300 mg、綠雲膏-水性、如意金黃散-油性及水性藥膠布具有顯著止痛作用，因此萬應膏、綠雲膏與如意金黃散應含有止痛中藥種類，根據中藥藥理資料，目前萬應膏中藥組成中有止痛藥效的中藥種類有川烏⁹⁻¹⁰、獨活⁹⁻¹¹、當歸⁹、甘草⁹、白芷¹²等，因此萬應膏之止痛藥效可能與以上五種中藥有關。綠雲膏所含中藥組成中有止痛藥效的中藥種類有黃連⁹與黃柏⁹等，因此綠雲膏之止痛藥效可能與以上兩種中藥有關。如意金黃散所含中藥組成中有止痛藥效的中藥種類有枯樓根¹³、白芷¹²、厚朴¹⁴、甘草⁹、天南星⁹等，因此如意金黃散之止痛藥效可能與以上五種中藥有關。

4.3 抗腫脹藥效動物試驗

在消腫效果方面，91 年度結果顯示綠雲膏-油性藥膠布與綠雲膏-水性藥膠布具有顯著抗 Carrageenan 引起之腫脹作用，其效果依序為綠雲膏-水性藥膠布 \approx 市售 Indomethacin 藥膠布 > 綠雲膏-油性藥膠布。92 年度結果顯示如意金黃散-油性及水性藥膠布具有顯著的抗 Carrageenan 引起之腫脹作用，此功效上如意金黃散-油性、如意金黃散-水性及市售 Indomethacin 藥膠布之抗腫脹效果相當。然繼續觀察 5~8 小時後之結果，發現正控制組之消腫曲線圖與實驗組有差異，正控制組在 3 小時時腫脹達最高點，之後則開始消腫，然實驗組在 1-3 小時腫脹較快，然 5-8 小時腫脹趨緩。此結果可藉穿透曲線（圖三十一與三十八）說明，觀察正控制組與實驗組之未知成分（以未知成分 A 為例）之穿透曲線趨勢不同，正控制組之 Indomethacin 穿透量一直持續上升，之故消腫藥效

可持續發揮；然實驗組之未知成分穿透量慢慢趨於緩和而使消腫藥效無法持續，因而呈現消腫功效後繼無力之現象。

基於上述結果，綠雲膏與如意金黃散應含有抗腫脹中藥種類，根據中藥藥理資料，目前綠雲膏中藥組成中有抗腫脹藥效的中藥種類有黃連⁹與黃柏^{9,15}，因此綠雲膏之抗腫脹藥效可能與以上兩種中藥有關。如意金黃散中藥組成中有抗腫脹藥效的中藥種類有枯樓根¹³、黃柏¹⁵、薑黃⁹、厚朴¹⁴等，因此如意金黃散之抗腫脹藥效可能與以上四種中藥有關。

4.4 消炎藥效試驗

在消炎效果方面，91 年度結果顯示僅以萬應膏-水性（1g）藥膠布有顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出，其效果與市售 Indomethacin 藥膠布相當。92 年度結果顯示如意金黃散-油性及水性藥膠布無顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出。

基於上述結果，萬應膏應含有消炎中藥組成，根據中藥藥理資料，目前萬應膏中藥組成中有消炎藥效的中藥種類有川烏⁹⁻¹⁰、甘草⁹、地黃⁹、當歸⁹及大黃¹⁵等，因此萬應膏之消炎藥效可能與以上五種中藥有關。

以上中藥藥理之文獻資料均以萃取物進行試驗所得之結果，加上中藥藥膠布所含中藥組成多其成分更是複雜，基於本計劃皮膚穿透 HPLC 方法乃針對萬應膏 11 種，綠雲膏 8 種，如意金黃散 8 種指標成分監測這些指標成分皮膚穿透之情況，並無法偵測所有成分之皮膚穿透，因此以上藥膠布中的有效中藥在藥效上之貢獻只能作推測。

伍、結論與建議

91-92 年連續計劃目的在建立一套藥膠布的皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物評估模式。在 91 年計畫已完成萬應膏與綠雲膏油性與水性藥膠布之皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物試驗。92 年計畫已完成如意金黃散藥膠布油性與水性之皮膚穿透、止痛、消腫及消炎藥效動物試驗。

皮膚穿透試驗：萬應膏-油性藥膠布有 Cinnamic acid、Ferulic acid 及 5 種未知成分；萬應膏-水性 (1g) 藥膠布有 Cinnamic acid、Sennoside B 及 5 種未知成分；萬應膏-水性 (300 mg) 藥膠布有 Cinnamic acid、Sennoside B 及 4 種未知成分；綠雲膏-水性藥膠布有 Baicalin 及 5 種未知成分；綠雲膏-油性藥膠布則僅有 1 種未知成分。如意金黃散-油性與水性藥膠布均未發現有指標成分之皮膚穿透，如意金黃散-油性藥膠布方面，至少有 4 種以上未知成分，而如意金黃散-水性藥膠布方面，穿透未知成分較多，至少有 6 種未知成分。

藥膠布皮膚穿透試驗可提供藥廠作為基劑配方的最佳化設計評估指標之一，其 HPLC 穿透層析圖亦可作為藥膠布品管上比對之依據。

止痛功效方面：萬應膏-油性藥膠布、萬應膏-水性 (1g) 藥膠布、萬應膏-水性 (300 mg) 藥膠布及綠雲膏-水性藥膠布均有顯著止痛作用，其效果依序為萬應膏-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 \approx 萬應膏-水性 (1g) 藥膠布 > 萬應膏-水性 (300 mg) 藥膠布 > 綠雲膏-水性藥膠布。如意金黃散-油性及水性藥膠布均具有顯著止痛功效，其中如意金黃散-油性比水性藥膠布藥效好，此藥效與釋放成分之種類數有相關性。依止痛效果大小依序為如意金黃散-油性藥膠布 > 市售 Indomethacin 藥膠布 \approx 如意金黃散-水性藥膠布。

抗腫脹效果方面：綠雲膏-油性藥膠布與綠雲膏-水性藥膠布有顯著抗腫脹作用，其效果依序為綠雲膏-水性藥膠布 \approx 市售 Indomethacin 藥膠布 > 綠雲膏-油性藥膠布。如意金黃散-油性及水性藥膠布均具有顯著的抗腫脹作用。如意金黃散-油性、如意金黃散-水性及市售 Indomethacin 藥膠布之抗腫脹效果相當。

消炎藥效試驗：萬應膏、綠雲膏及如意金黃散藥膠布中僅以萬應膏-水性 (1g) 藥膠布有顯著抑制組織胺所引起之染劑滲出，功效與市售 Indomethacin 藥膠布相當。

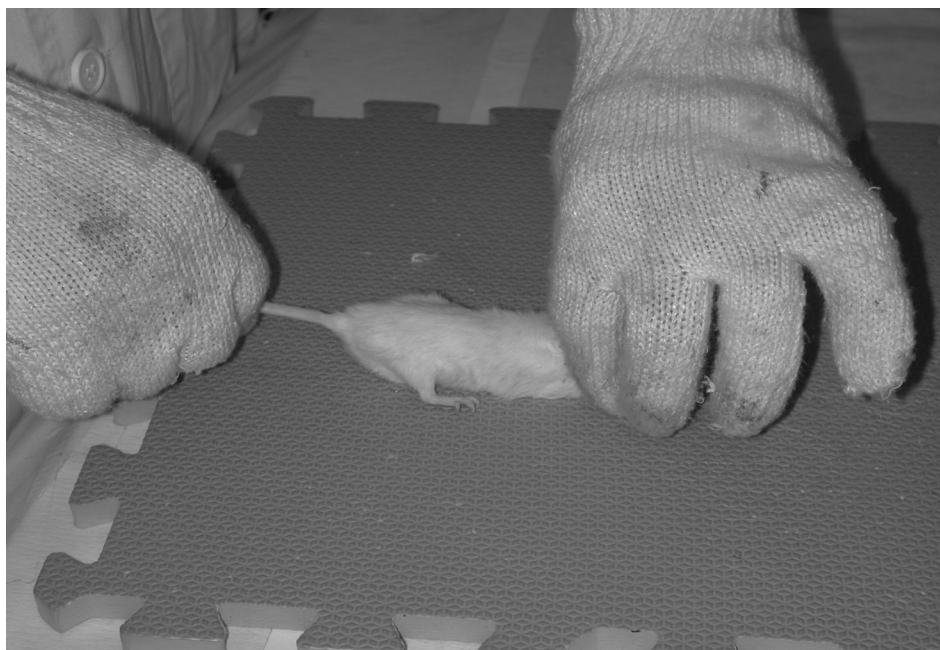
整體觀察，萬應膏之藥效主要為止痛功效；綠雲膏主要為消腫功效；如意金黃散之藥效主要為止痛與抗腫脹功效。此外、不同藥膠布基劑會影響藥膠布之穿透成分與釋放成份種類與穿透量，進而支配其藥效之展現。

關目前國內藥膠布擁有相當龐大之市場，然藥膠布中成份的皮膚穿透；及其藥效如消腫、消炎及止痛評估，皆缺乏規範以進行科學驗證，其品質堪慮。此動物試驗模式將可在藥膠布品質管制與藥效確認上提供主管單位制定藥膠布管理規範上之參考依據，以確保藥膠布之品質與有效性，在民眾用藥上多一層保障。

陸、參考文獻

1. Gurny R, Teubner A, Dermal and Transdermal Drug Delivery-New Insights and Perspectives, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1993.
2. Kitagawa S, Hosokai A, Kaseda Y, Yamamoto N, Kaneko Y, Matsuoka E. Permeability of Benzoic Acid Derivatives in Excised Guinea Pig Dorsal Skin and Effects of L-menthol. *Int. J. Pharm.* 1998; 161: 115-122.
3. Kitagawa S, Li H, Sato S. Skin Permeation of Parabens in Excised Guinea Pig Dorsal Skin, Its Modification by Penetration Enhancers and Their Relationship with n-octanol/water Partition Coefficients. *Chem. Pharm. Bull.* 1997; 45(8): 1354-1357.
4. Chen FA, Wu AB, Huang KK, Liao JW, Chen CY. Enhancement of the Skin Penetration of Alkannin/shikonin Enantiomers by Tooki Extract. *Chin. Pharm. J.* 2001; 53(1): 15-25.
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. Rats. *N-S Arch Pharmacol.* 1990; 342: 189-193.
8. Tanaka S, Tajima M, Tsukada M, Tabata M. A Comparative Study on Anti-inflammatory Activities of the Enantiomers, Shikonin and Alkannin. *J. Nat. Prod.* 1986; 49(3): 466-469.
9. 中藥藥理及應用，啟業書局，1986；pp105, 163, 167, 372, 250, 726, 738, 779, 882, 892。
10. Shi H, Zhou C, Li Y, Wang G, Sun Y. Anti-inflammatory effect of aconitines. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1990；15(3):174-177.
11. Chen YF, Tsai HY, Wu TS. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica* 1995；61(1): 2-8.
12. Li H, Dai Y, Zhang H, Xie C. Pharmacological studies on the Chinese drug radix *Angelicae dahuricae*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1991；16(9):560-2, 576.
13. Ozaki Y, Xing L, Satake M. Antiinflammatory effect of *Trichosanthes kirilowii* Maxim, and its effective parts. *Biolo. & Pharm. Bull.* 1996；19(8):1046-1048.
14. Wang JP, Hsu MF, Raung SL, Chen CC, Kuo JS, Teng CM. Anti-inflammatory and analgesic effects of magnolol. *N-S Arch Pharmacol.* 1992；346(6): 707-712.
15. Cuellar MJ, Giner RM, Recio MC, Manez S, Rios JL. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. *Fitoterapia* 2001；72(3): 221-229.

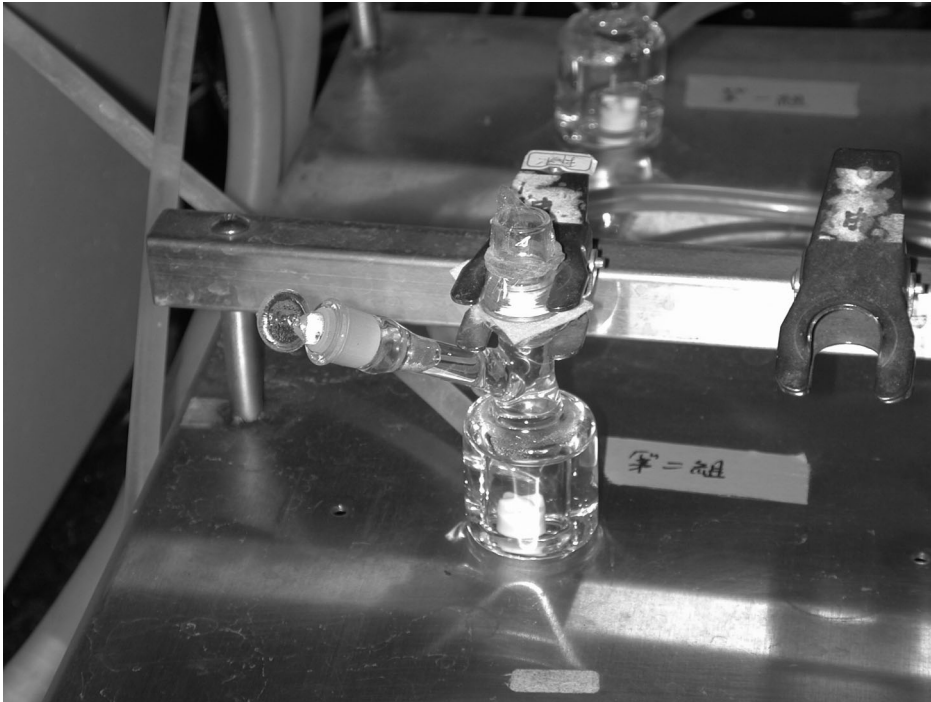
柒、圖、表



圖一、皮膚穿透試驗：小白鼠頸椎斷離犧牲圖



圖二、皮膚穿透試驗：小白鼠腹部皮膚取下圖



圖三、皮膚穿透試驗：以 Franz cell 進行藥膠布成分穿透圖



圖四、止痛試驗：藥膠布貼於小白鼠腹部圖



圖五、止痛試驗：小白鼠 Writhing 圖



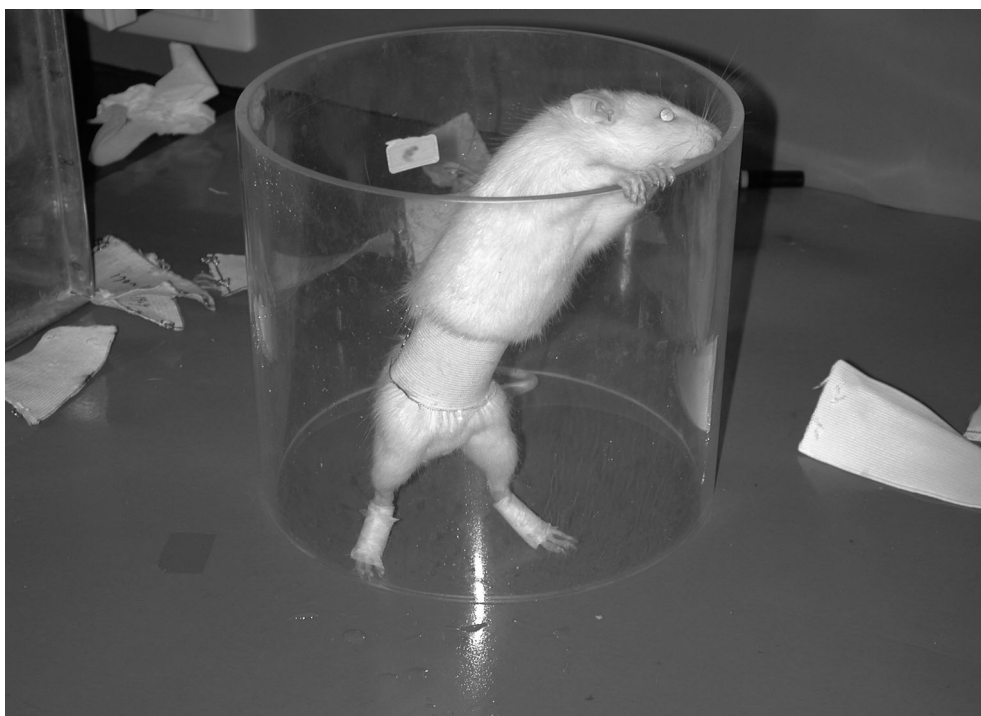
圖六、抗腫脹試驗：大白鼠足蹠畫測量線圖



圖七、抗腫脹試驗：大白鼠足蹠體積測量圖



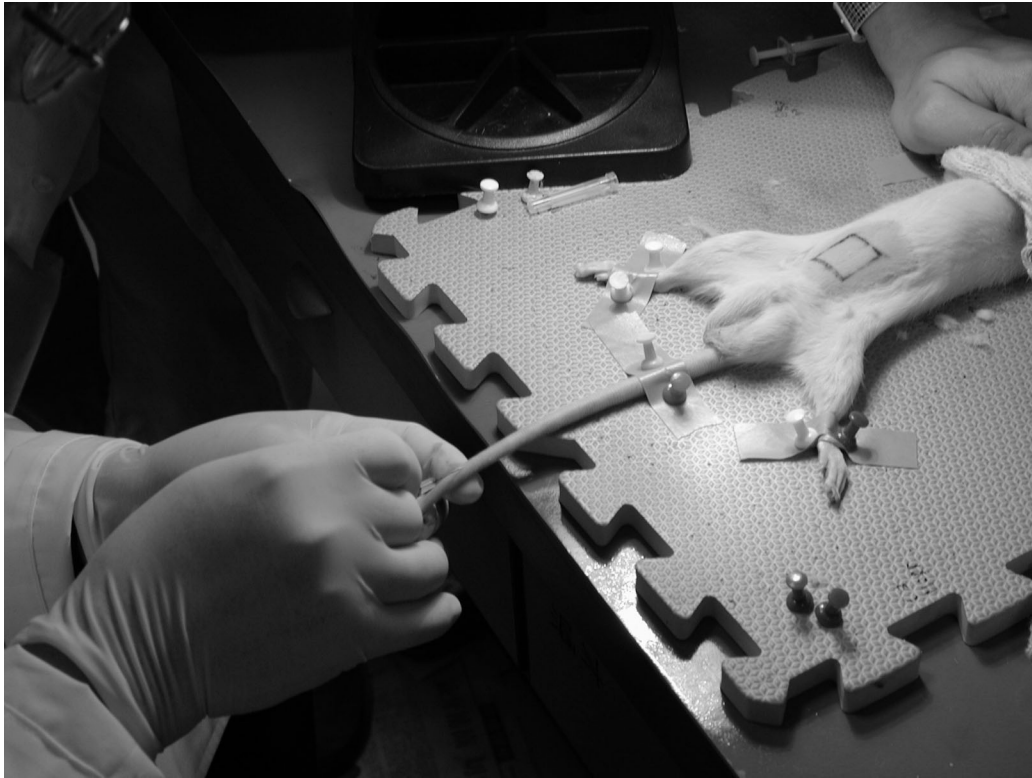
圖八、抗腫脹試驗：大白鼠穿自製束腹彈性繃帶圖



圖九、抗腫脹試驗：大白鼠足蹠貼藥膠布及透氣膠帶固定圖



圖十、消炎試驗：大白鼠腹部貼藥膠布及透氣膠帶固定圖



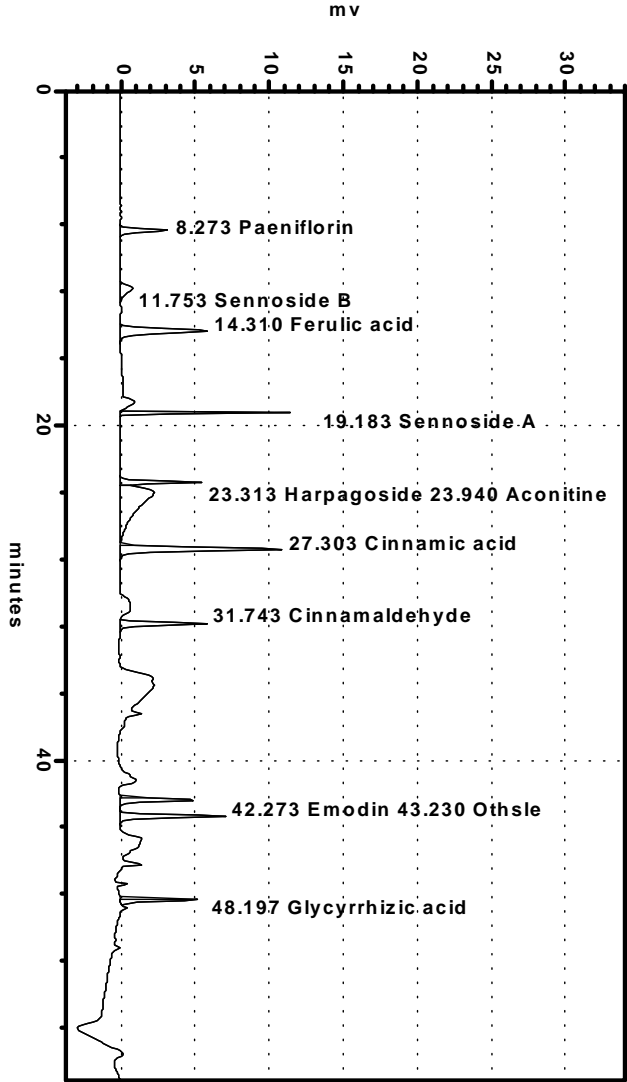
圖十一、消炎試驗：自大白鼠尾靜脈打入染劑圖



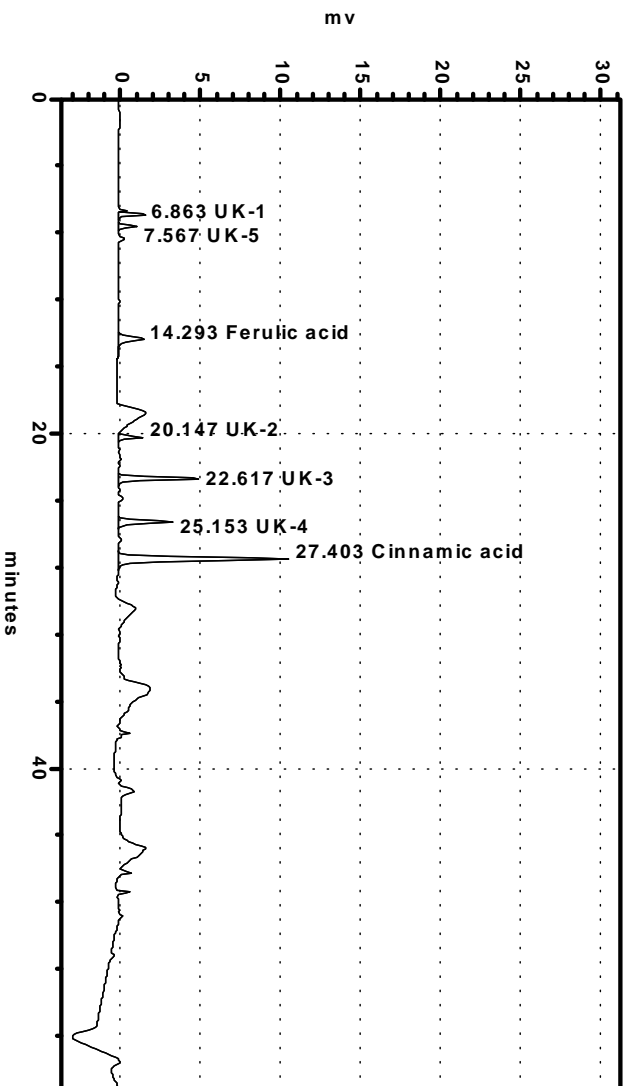
圖十二、消炎試驗：腹部皮內注射 0.05 mL 組織胺



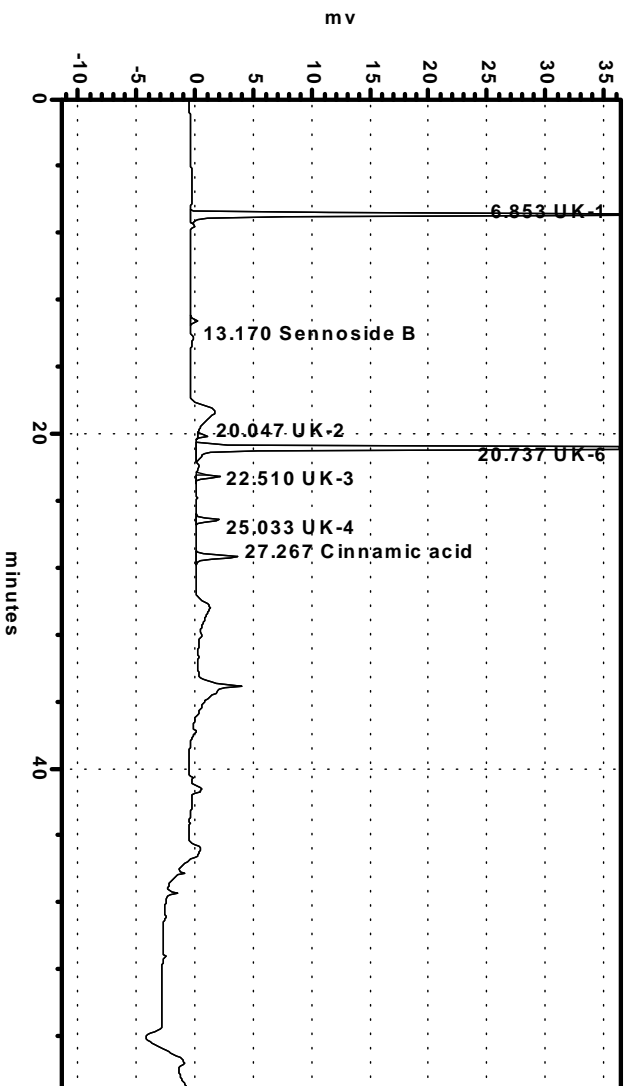
圖十三、犧牲大白鼠取下皮膚圖



圖十四、萬應膏指標成分(11種)之層析圖



圖十五、48小時皮膚穿透後，萬應膏油性藥貼之層析圖



圖十六、48小時皮膚穿透後，萬應膏水性（1g）藥貼之層析圖

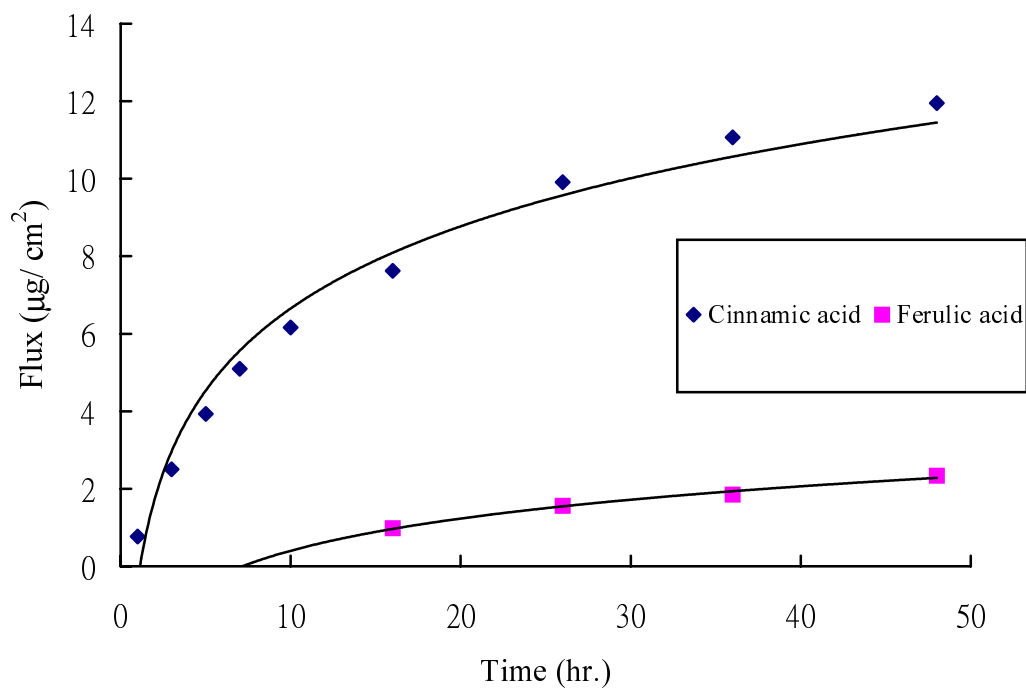


圖 十七、萬應膏油性藥貼-已知成分之藥物滲透曲線圖

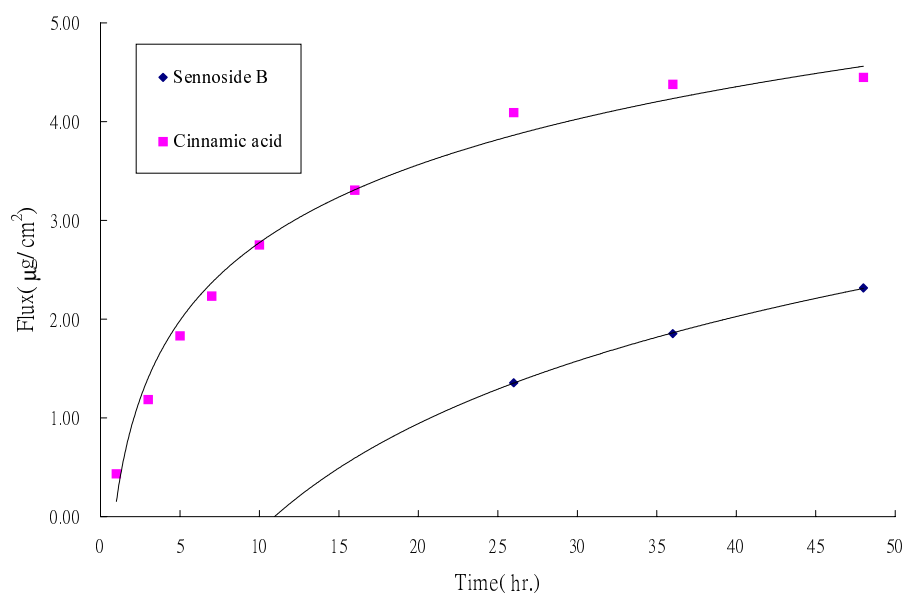


圖 十八、萬應膏水性 (1g) 藥貼-已知成分之藥物滲透曲線圖

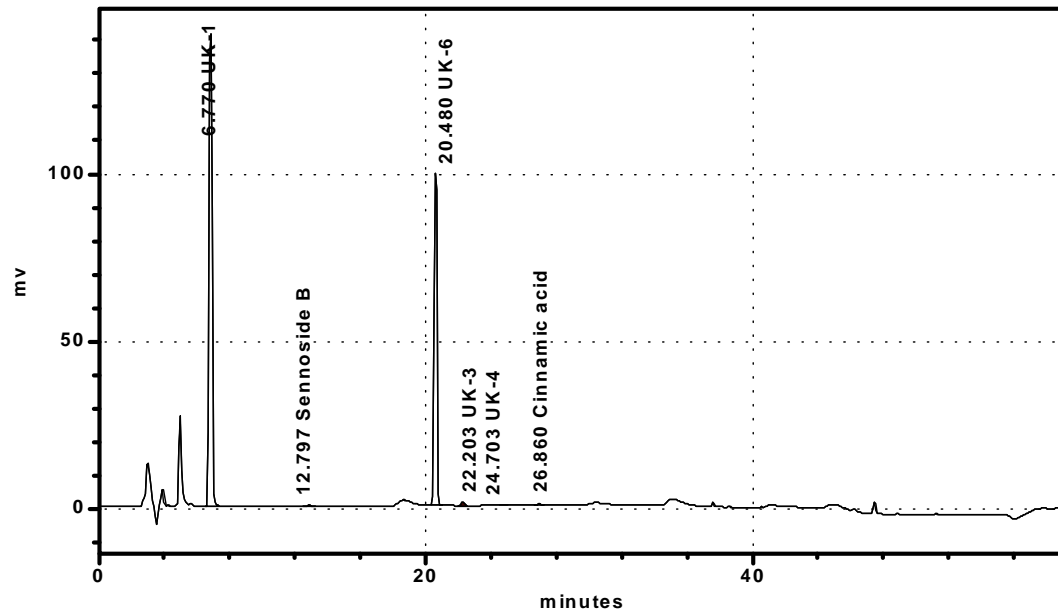


圖 十九、萬應膏水性（300 mg）藥貼 48 小時皮膚穿透後之層析圖

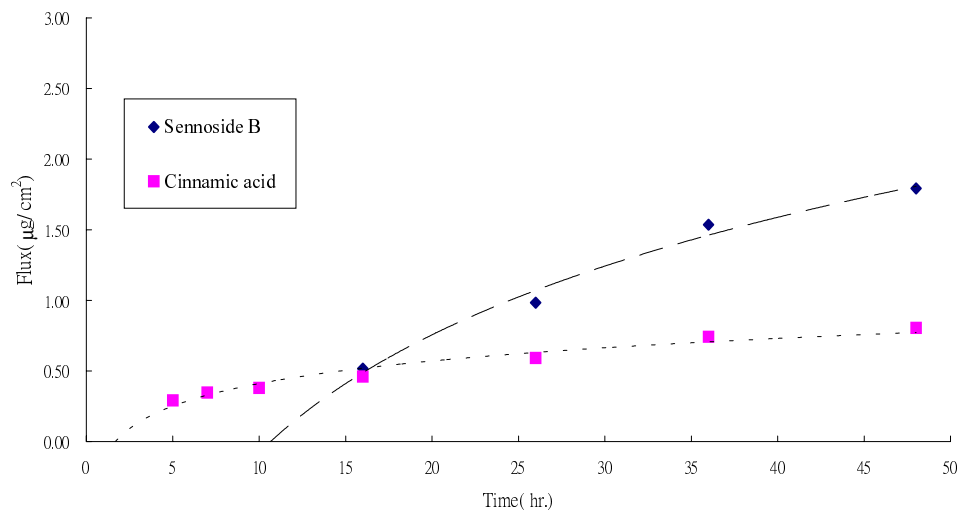
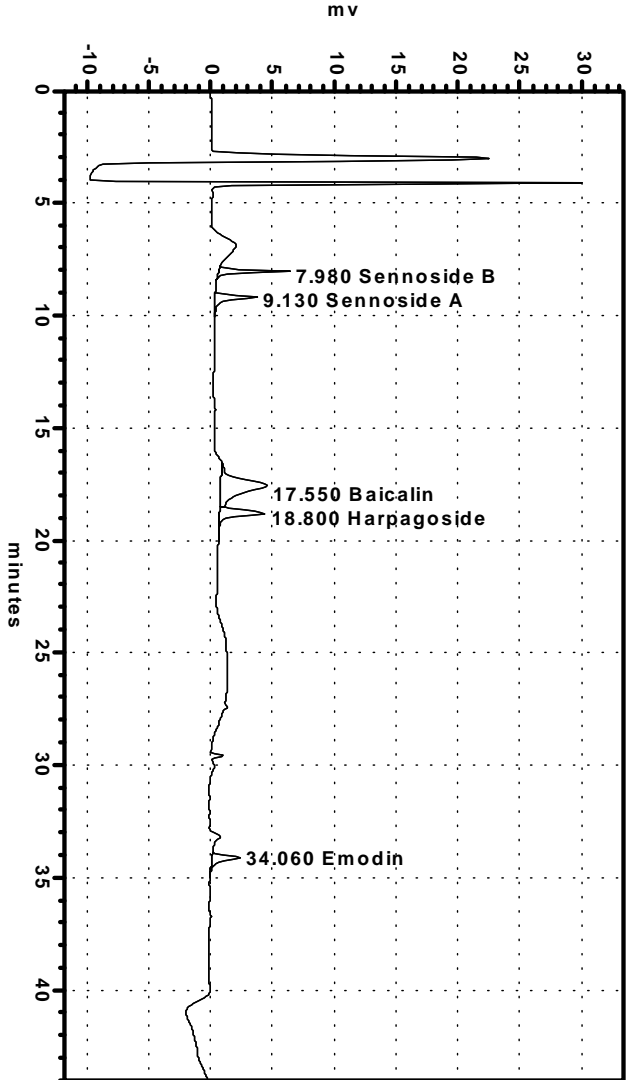
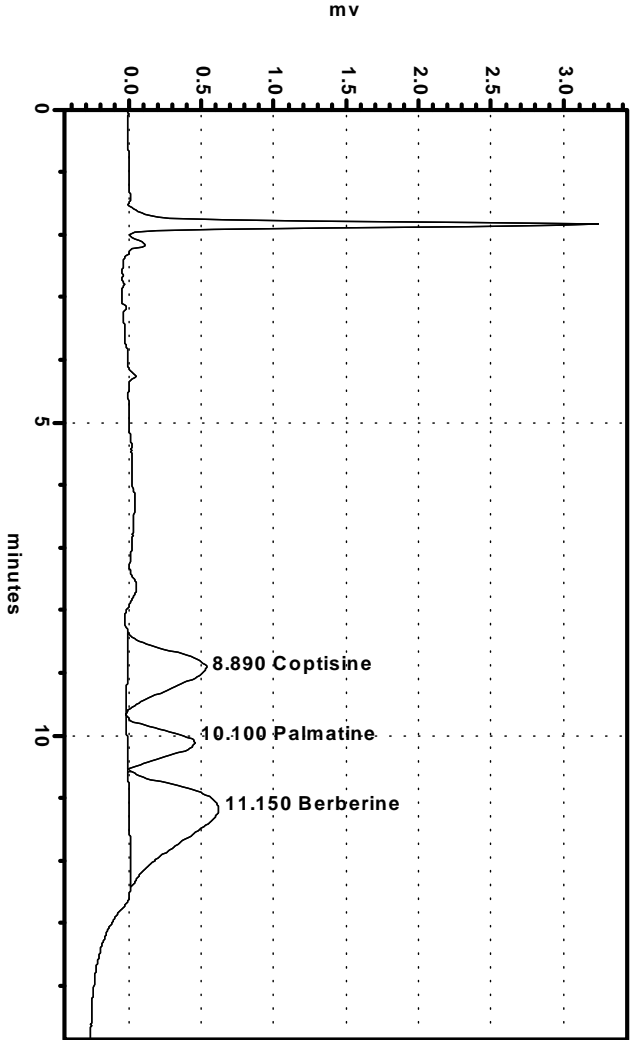


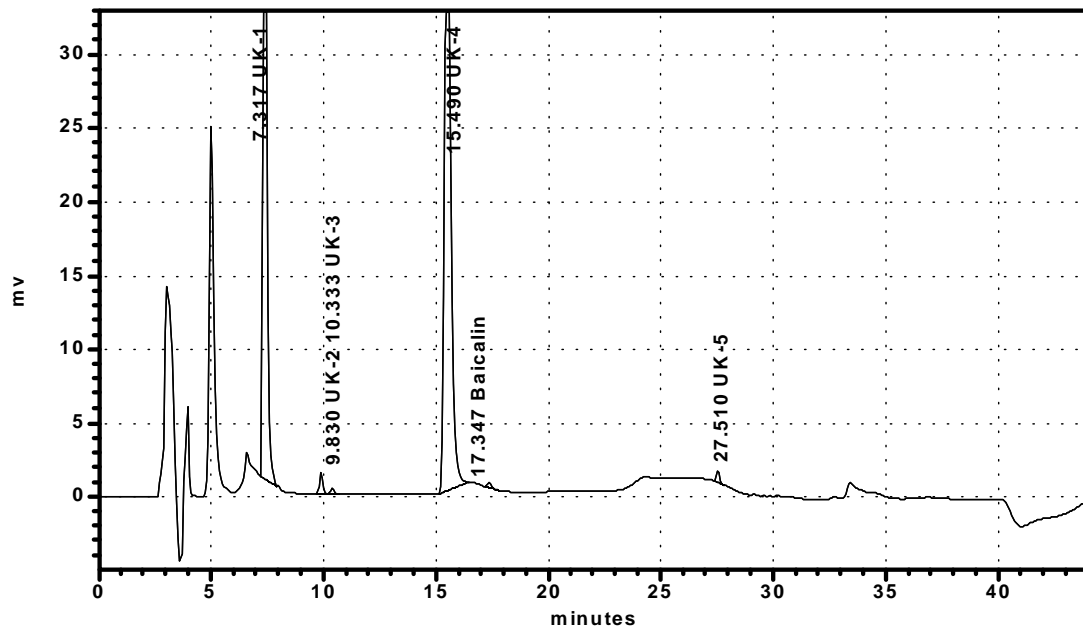
圖 二十、萬應膏水性（300mg）藥貼-已知成分之藥物滲透曲線圖



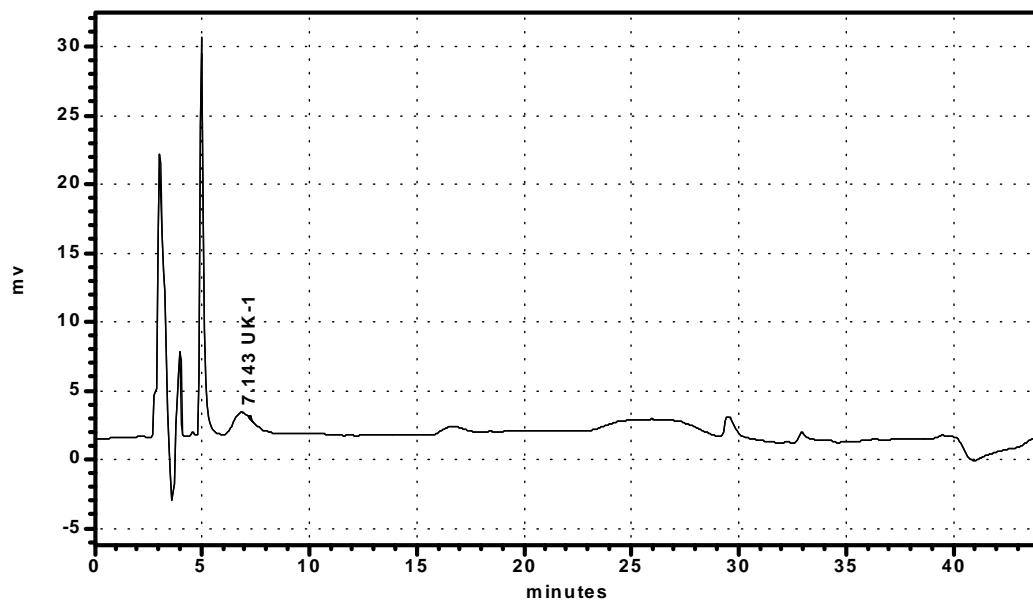
圖二十一、綠云膏 5 種指標成分之層析圖



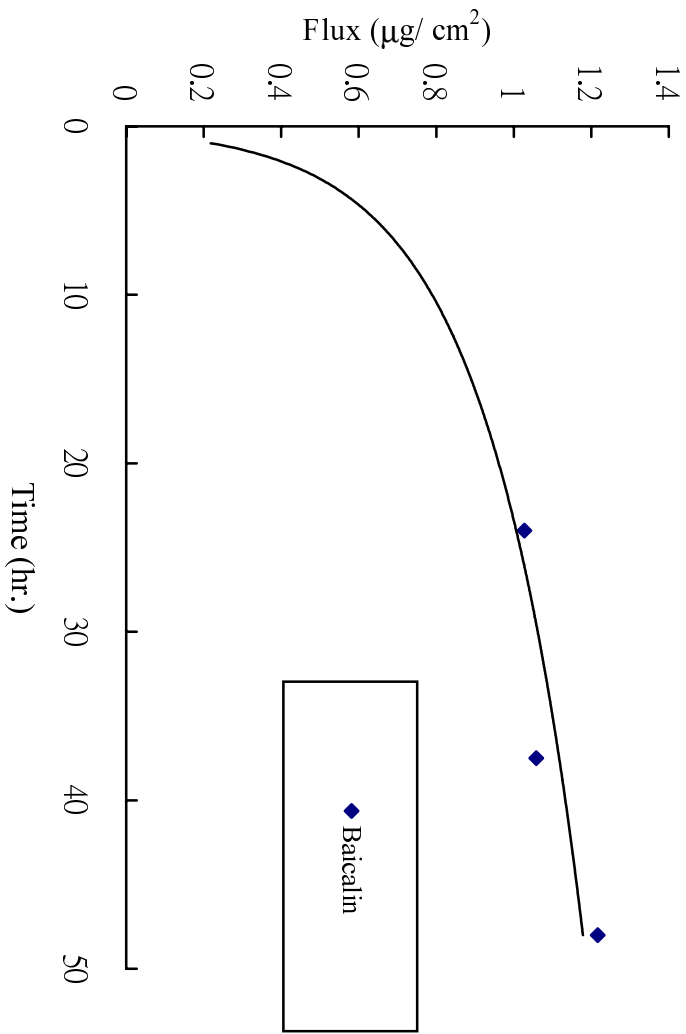
圖二十二、綠雲膏 3 種指標成分之 HPLC 層析圖



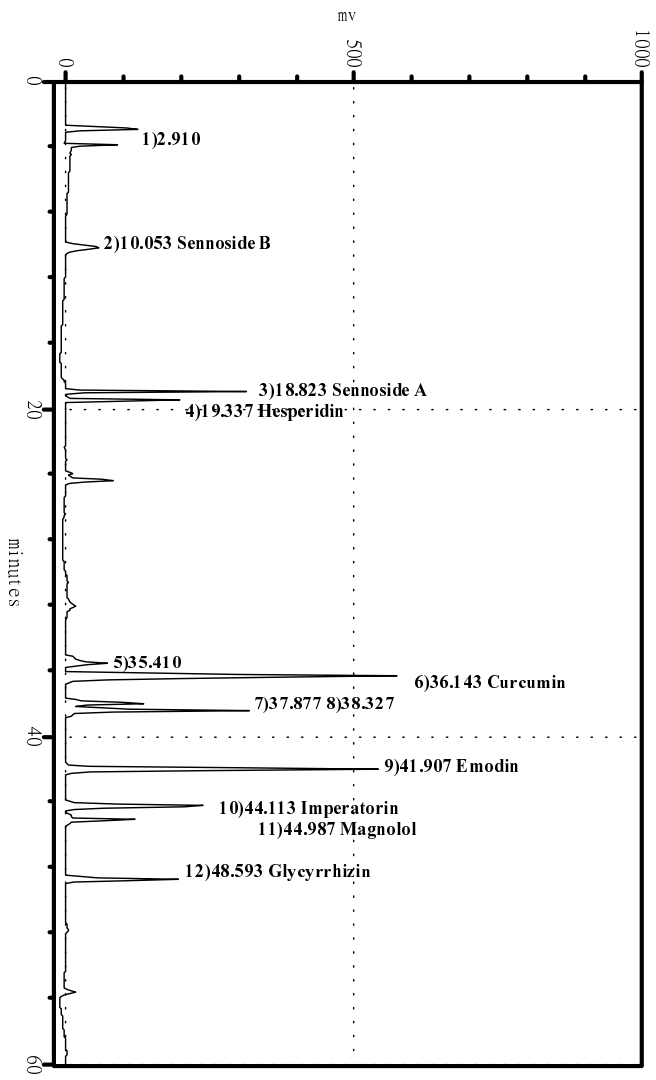
圖二十三、綠云膏水性藥貼 48 小時皮膚穿透後之層析圖



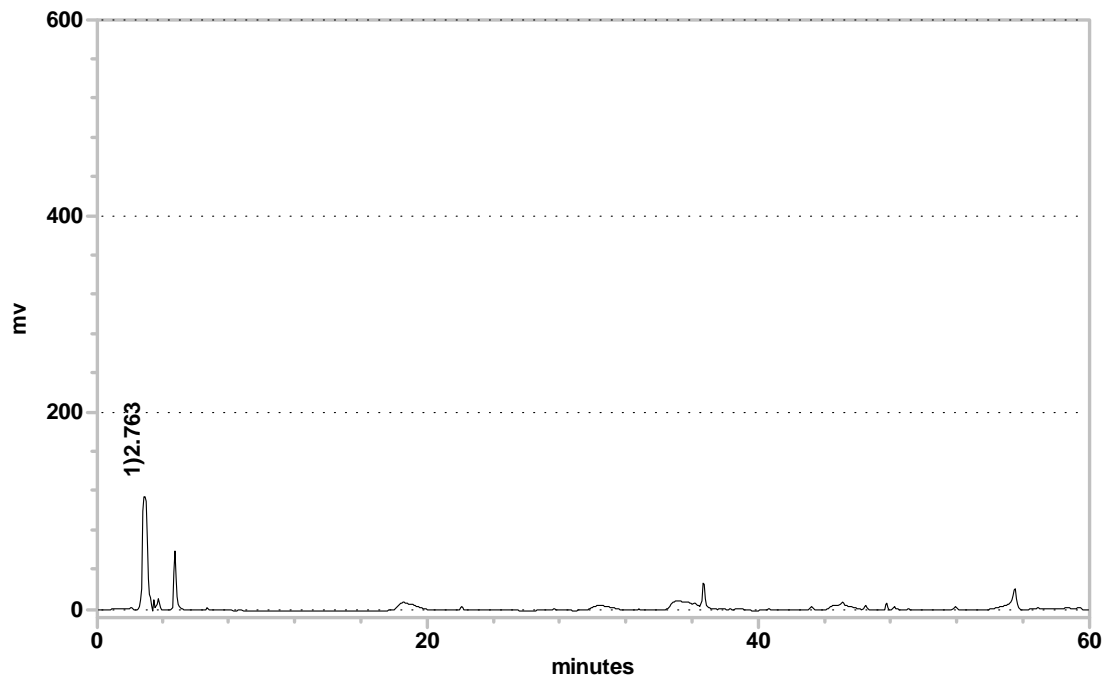
圖二十四、綠云膏油性藥貼 48 小時皮膚穿透後之層析圖



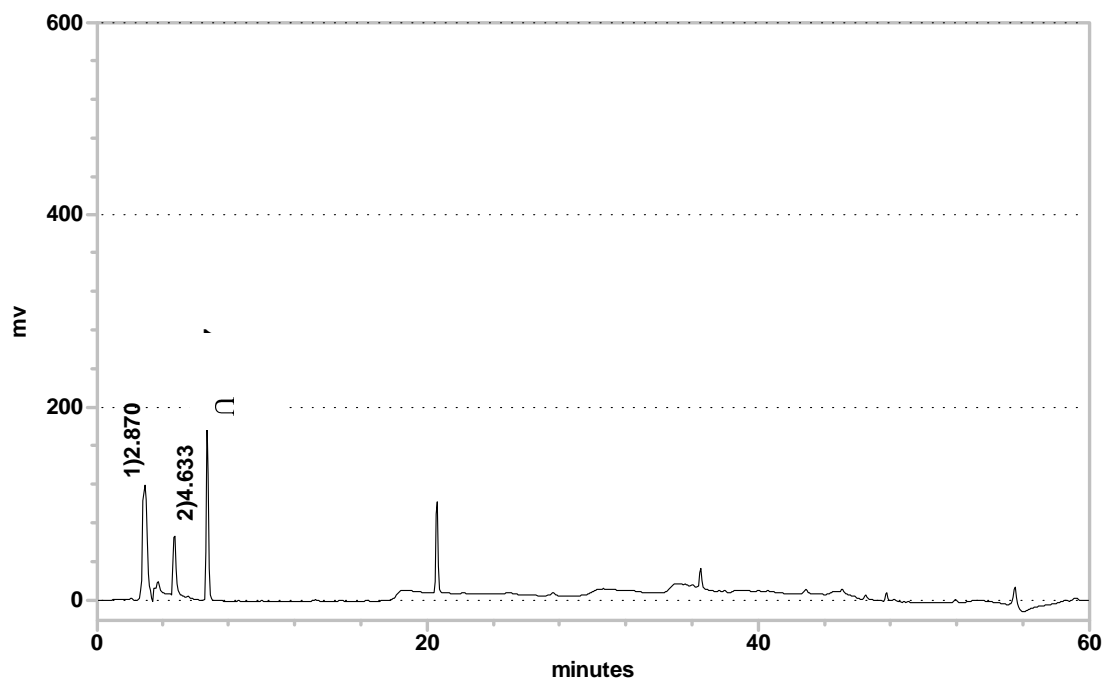
圖二十五、綠云膏水性藥貼-已知成分之藥物滲透曲線圖



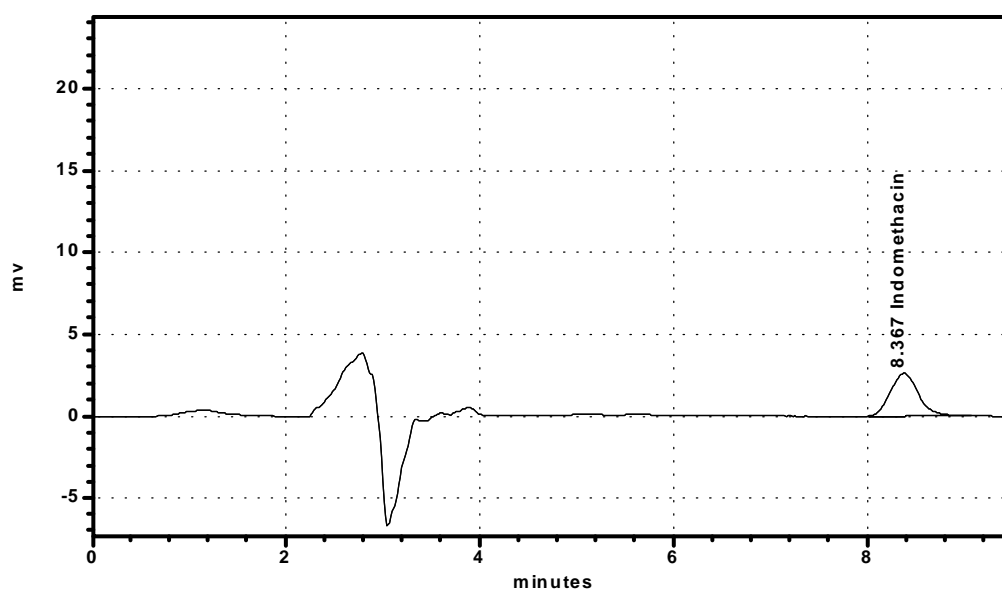
圖二十六、如意金黃散指標成分（8種）之層析圖



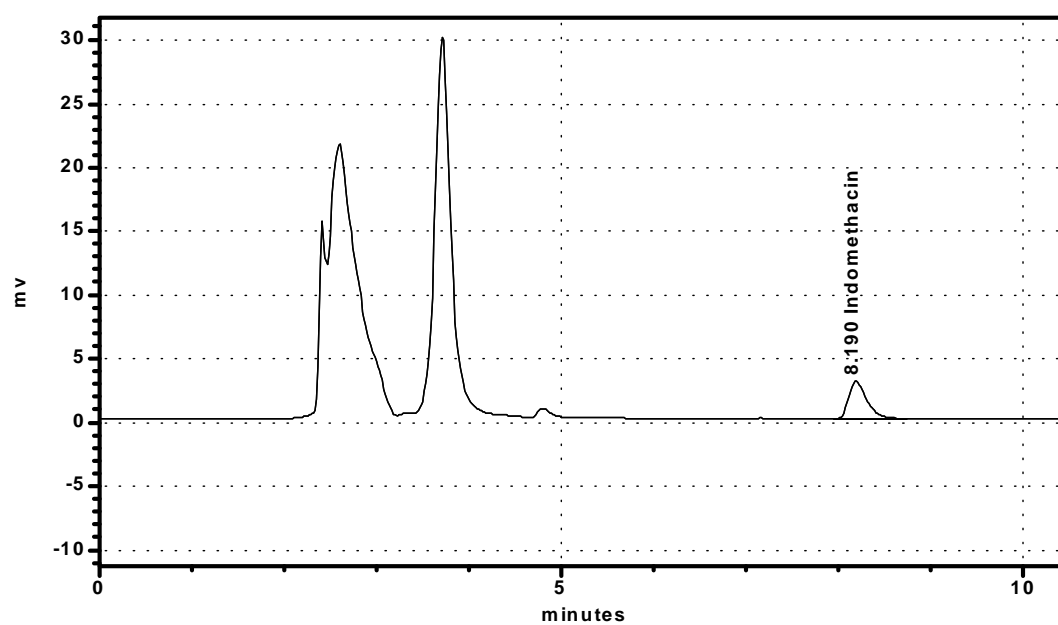
圖二十七、 48 小時皮膚穿透後，如意金黃散油性藥貼之層析圖



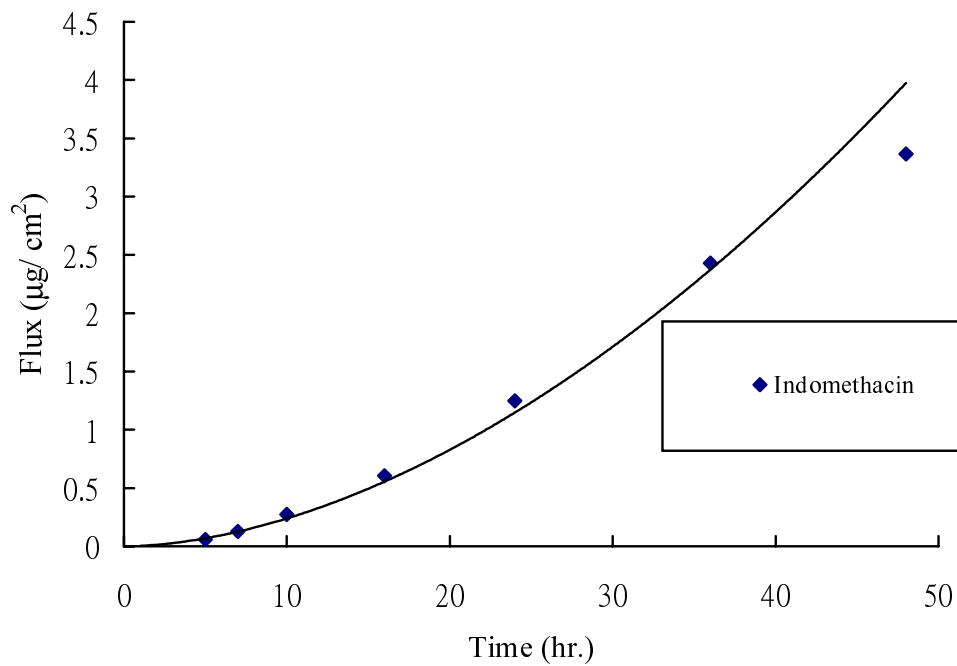
圖二十八、 48 小時皮膚穿透後，如意金黃散水性藥貼之層析圖



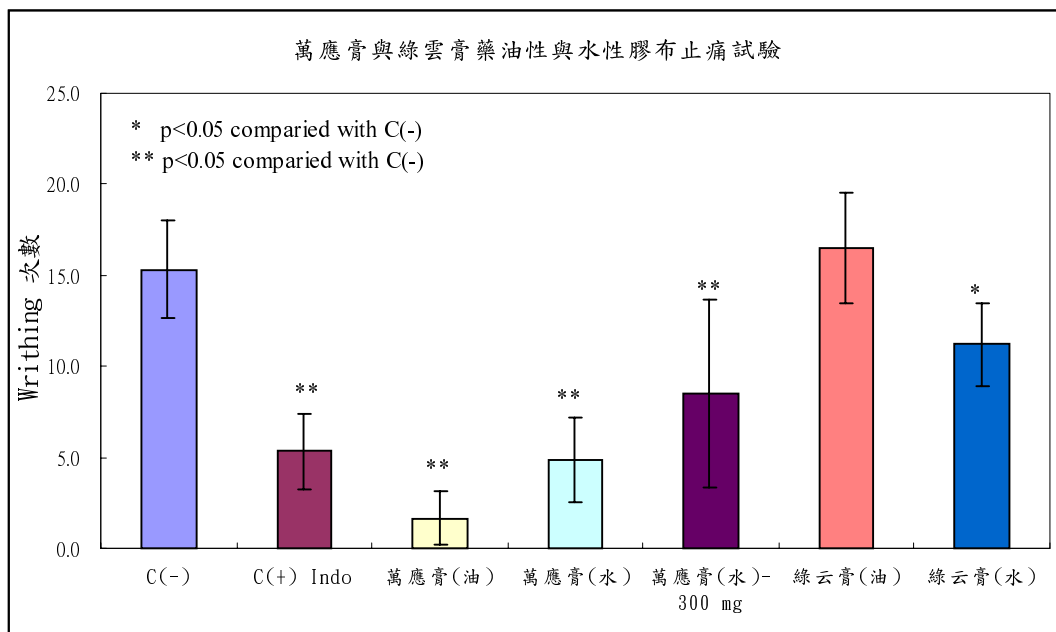
圖二十九、Indomethacin HPLC 層析圖



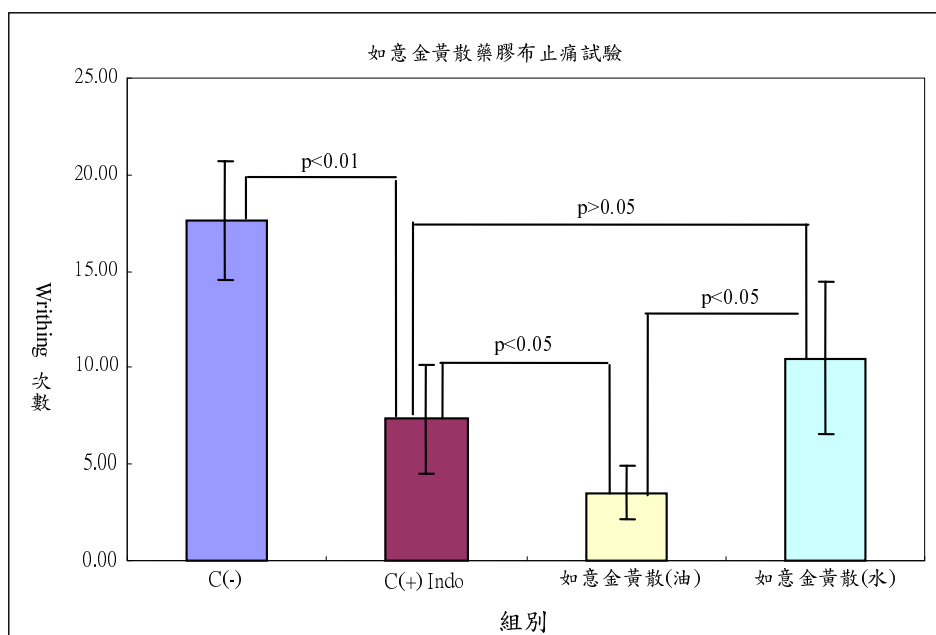
圖三十、Indomethacin 藥貼 48 小時皮膚穿透後之層析圖



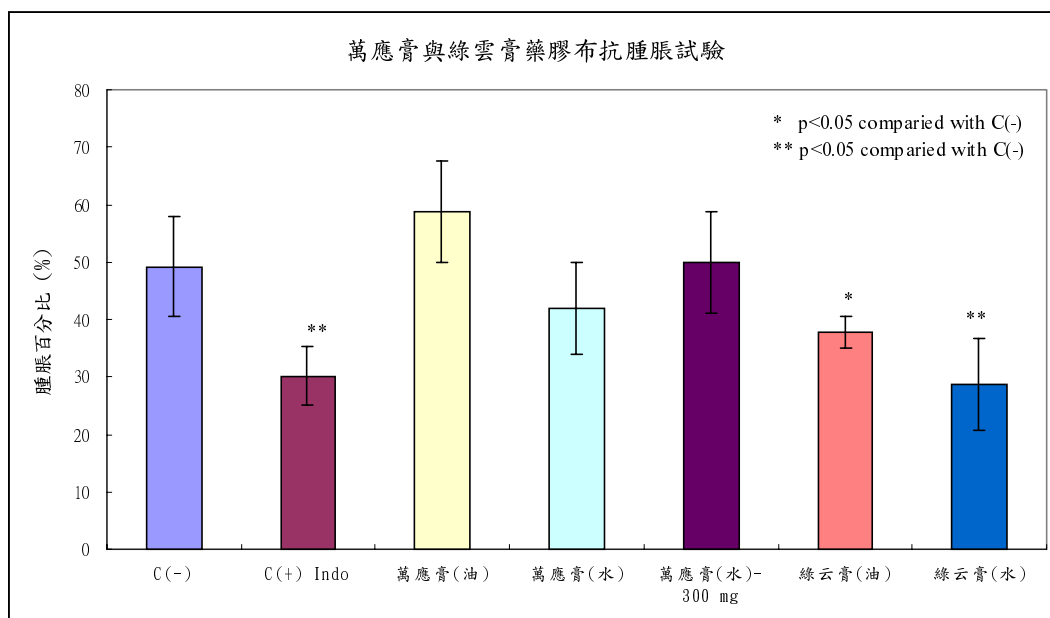
圖三十一、市售 Indomethacin 藥貼之穿透曲線圖



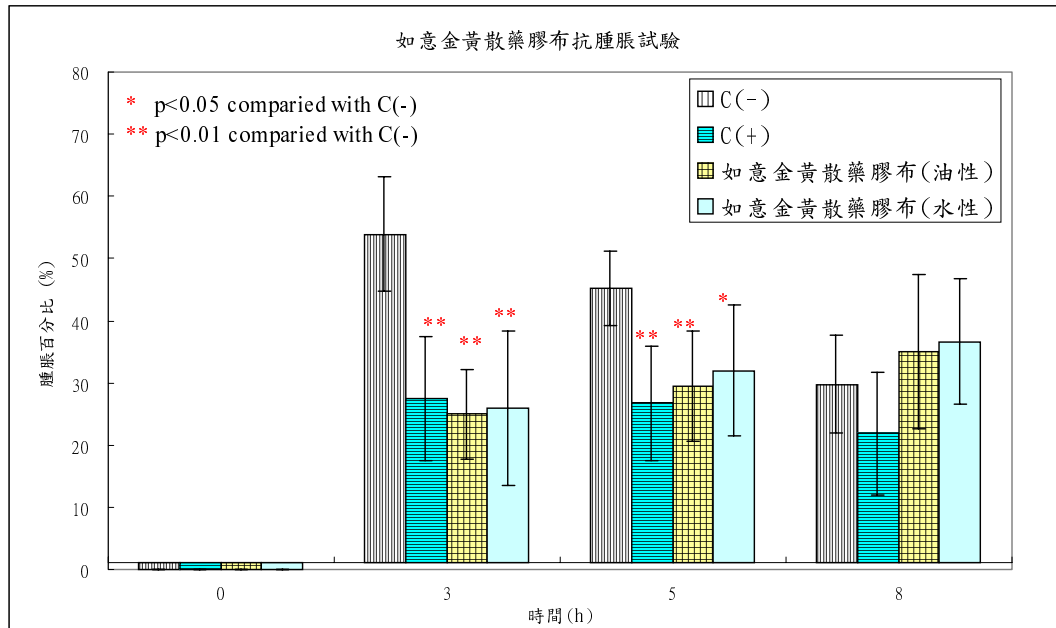
圖三十二、萬應膏與綠雲膏藥膠布之止痛功效圖



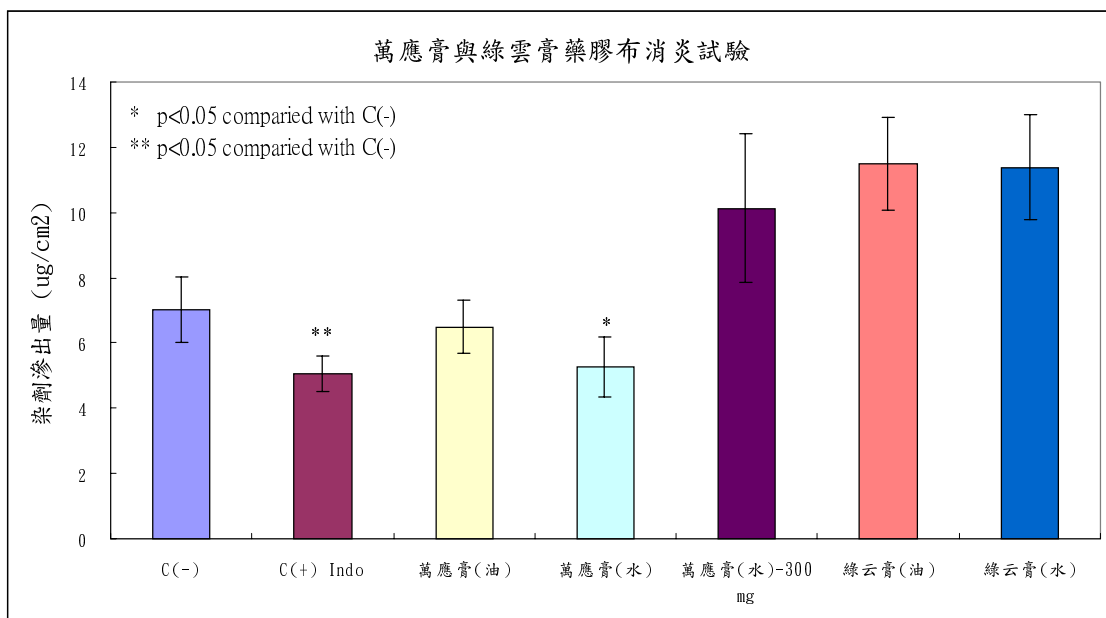
圖三十三、如意金黃散藥膠布之止痛功效圖



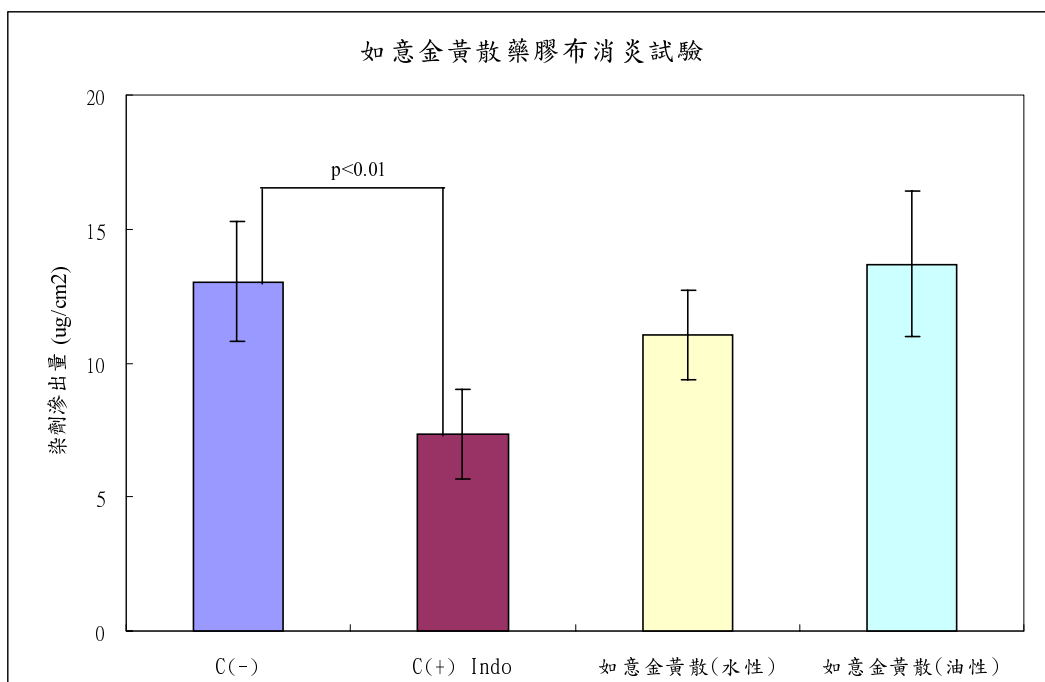
圖三十四、萬應膏與綠雲膏藥膠布之抗腫脹功效圖



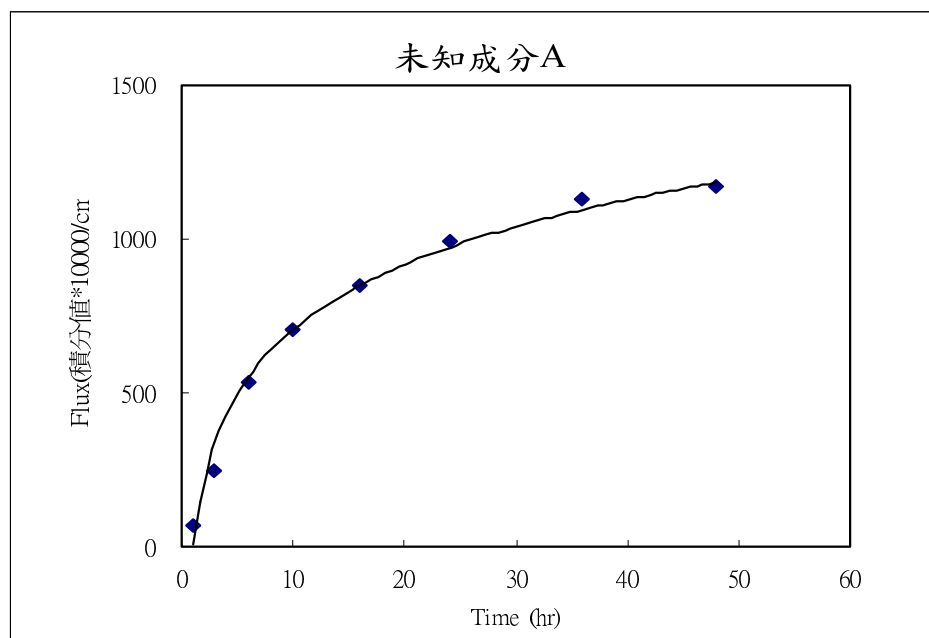
圖三十五、如意金黃散藥膠布之抗腫脹功效圖



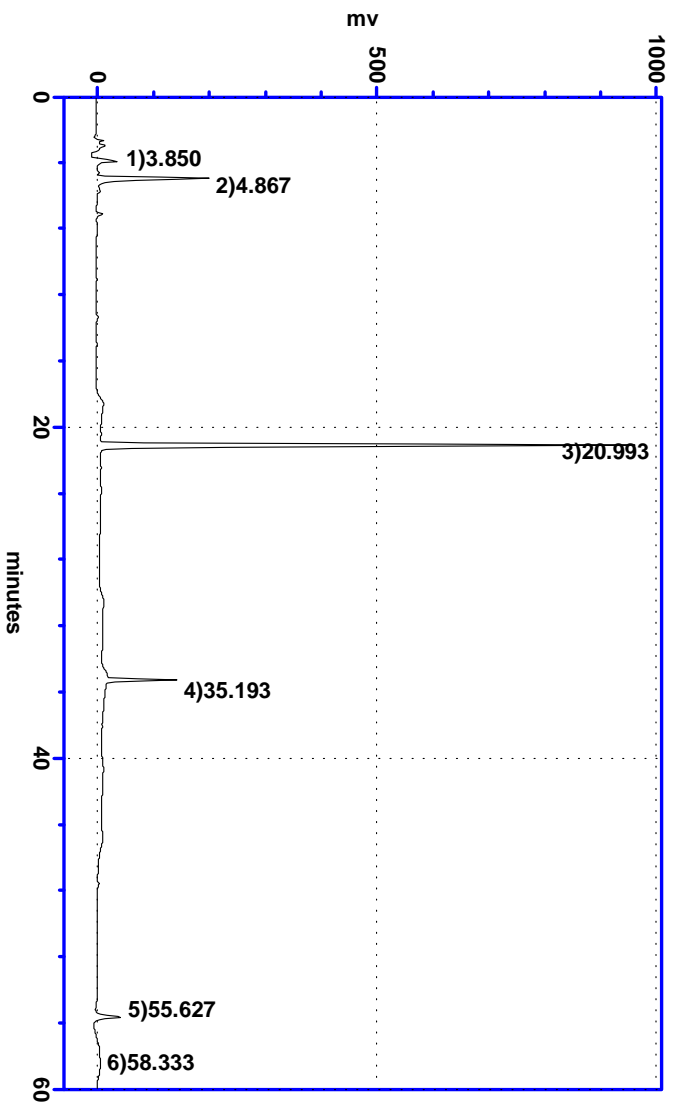
圖三十六、萬應膏與綠雲膏藥膠布之消炎功效圖



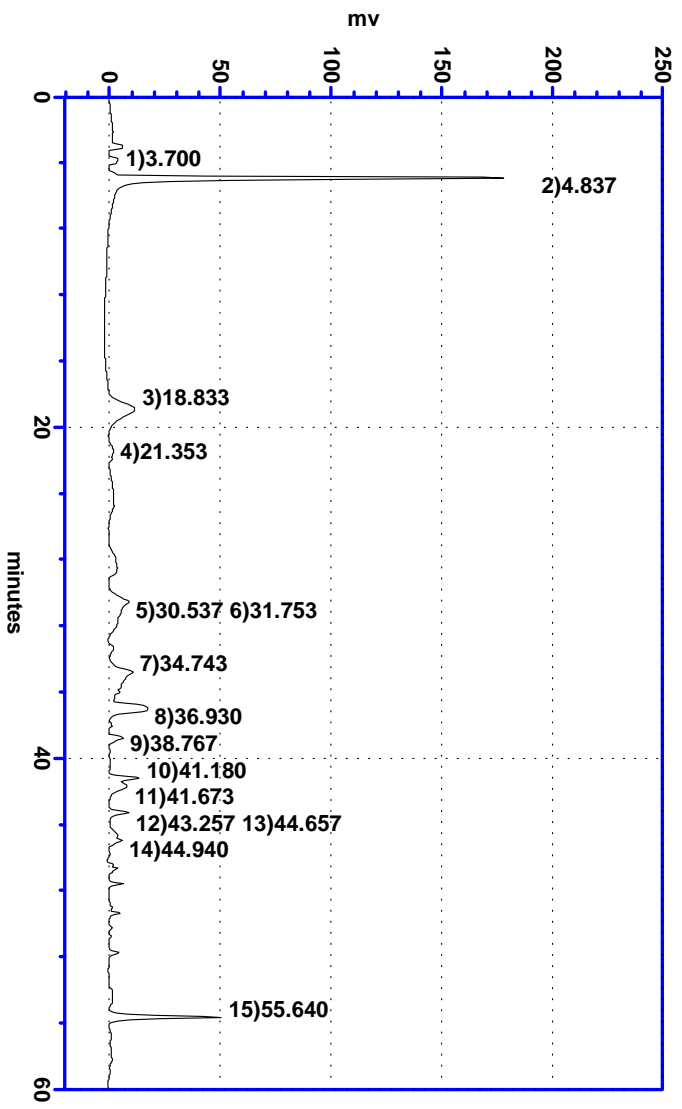
圖三十七、如意金黃散藥膠布之消炎功效圖



圖三十八、如意金黃散藥膠布未知成分 A 之穿透曲線圖



圖三十九、如意金黃散水性藥貼 48 小時後之成分釋放層析圖



圖四十、如意金黃散油性藥貼 48 小時後之成分釋放層析圖

表一、萬應膏穿透成分之 HPLC 分析法精密度

萬應膏	Concentration	Mean \pm S.D. (C.V. %)	
	($\mu\text{g/mL}$)	Intraday ^a	Interday ^b
Sennoside B	0.25	0.25 \pm 0.01 (2.8)	0.24 \pm 0.01 (5.4)
	0.5	0.48 \pm 0.02 (3.8)	0.49 \pm 0.02 (4.7)
	1	0.92 \pm 0.03 (3.3)	0.96 \pm 0.04 (4.3)
	2	1.80 \pm 0.03 (1.7)	1.86 \pm 0.09 (4.8)
	4	3.67 \pm 0.20 (5.4)	4.01 \pm 0.31 (7.7)
Cinnamic acid	0.25	0.27 \pm 0.01 (3.8)	0.27 \pm 0.01 (3.2)
	0.5	0.52 \pm 0.00 (0.5)	0.53 \pm 0.02 (3.0)
	1	0.96 \pm 0.05 (5.1)	1.00 \pm 0.05 (4.8)
	2	1.84 \pm 0.03 (1.7)	1.91 \pm 0.09 (4.9)
	4	3.82 \pm 0.19 (4.9)	4.04 \pm 0.22 (5.4)
Ferulic acid	0.25	0.30 \pm 0.01 (3.7)	0.29 \pm 0.01 (2.5)
	0.5	0.56 \pm 0.00 (0.6)	0.55 \pm 0.02 (2.8)
	1	0.98 \pm 0.05 (5.2)	0.94 \pm 0.07 (6.9)
	2	1.92 \pm 0.03 (1.7)	1.92 \pm 0.07 (3.7)
	4	3.94 \pm 0.20 (5.0)	4.05 \pm 0.13 (3.2)

^a n=3, Repeat injection three times on the same day.^b n=3, Repeat injection three times each day and a successive three-day.

表二、綠雲膏穿透成分 Baicalin 之 HPLC 分析法精密度

Concentration	Mean \pm S.D. (C.V. %)	
($\mu\text{g/mL}$)	Intraday ^a	Interday ^b
0.50	0.57 \pm 0.01 (1.4)	0.56 \pm 0.01 (2.1)
0.75	0.76 \pm 0.01 (1.2)	0.71 \pm 0.03 (4.7)
1.00	1.23 \pm 0.03 (2.4)	1.13 \pm 0.10 (8.5)
2.00	2.03 \pm 0.05 (2.5)	1.76 \pm 0.21 (11.7)
4.00	4.09 \pm 0.14 (3.4)	4.09 \pm 0.17 (4.2)

^a n=3, Repeat injection three times on the same day.

^b n=3, Repeat injection three times each day and a successive three-day.

表三、Indomethacin 之 HPLC 分析法精密度

Concentration	Mean \pm S.D. (C.V. %)	
($\mu\text{g/mL}$)	Intraday ^a	Interday ^b
0.01	0.01 \pm 0.00 (4.3)	0.01 \pm 0.00 (5.8)
0.05	0.05 \pm 0.00 (2.6)	0.05 \pm 0.01 (14.8)
0.10	0.10 \pm 0.00 (1.0)	0.10 \pm 0.00 (1.3)
0.25	0.25 \pm 0.00 (0.9)	0.25 \pm 0.00 (1.7)
0.50	0.50 \pm 0.00 (0.1)	0.50 \pm 0.00 (0.8)

^a n=3, Repeat injection three times on the same day.

^b n=3, Repeat injection three times each day and a successive three-day.

表四、如意金黃散指標成分之 HPLC 分析法精密度

如意金黃膏	Concentration	Mean±S.D.(C.V.%)	
		$\mu\text{g/mL}$	
Hesperidin	1	1.14±0.03(2.68)	1.14±0.03(2.68)
	5	5.05±0.06(1.23)	5.05±0.06(1.23)
	10	10.05±0.04(0.70)	10.04±0.07(0.66)
Sennoside A	1	1.09±0.01(1.00)	1.08±0.04(3.83)
	5	4.98±0.03(0.56)	4.99±0.06(1.24)
	10	9.96±0.02(0.22)	10.01±0.04(0.44)
Sennoside B	1	1.11±0.04(3.76)	1.11±0.06(5.22)
	5	4.99±0.03(0.64)	4.99±0.06(1.24)
	10	9.96±0.03(0.28)	9.96±0.04(0.41)
Glycyrrhizin acid	1	1.23±0.03(2.12)	1.23±0.03(2.84)
	5	5.18±0.11(1.47)	5.18±0.07(1.39)
	10	10.52±0.03(0.75)	10.52±0.20(1.90)
Curcumin	1	1.10±0.02(1.27)	1.10±0.02(2.13)
	5	4.97±0.05(0.69)	4.97±0.03(0.62)
	10	10.00±0.06(0.66)	10.00±0.09(0.89)
Imperatorin	1	1.06±0.02(1.33)	1.06±0.02(2.32)
	5	5.07±0.05(1.00)	5.07±0.05(0.95)
	10	10.02±0.03(0.23)	10.09±0.16(1.58)
Emodin	1	1.09±0.01(1.01)	1.09±0.01(1.01)
	5	5.05±0.09(1.74)	5.05±0.10(1.99)
	10	10.05±0.05(0.46)	10.05±0.05(0.46)
Magnonal	1	0.96±0.02(1.50)	0.96±0.01(1.48)
	5	5.21±0.28(5.34)	5.21±0.27(5.17)
	10	10.12±0.22(2.17)	10.12±0.39(3.85)

^a n=3, Repeat injection three times on the same day.^b n=3, Repeat injection three times each day and a successive three-day.

