

## 貳、實驗

### 一、儀器設備

- 1、電子分析天平：AG104，Mettler toledo，瑞士。
- 2、粉碎機：RT-02B，濟生，台灣。
- 3、純水製造機(Water Purification Equipment)：Milli-Q-Academic，Milliproe 美國。
- 4、離心機：Hettich Zentrifugen D-7200，Tuttlingen，德國。
- 5、均質機(Homogenizer)：Ultra Turrax T25 basic，IKA<sup>®</sup> Works(Asia)，馬來西亞。
- 6、紫外光可見光光譜儀(UV-Visible spectrophotometer)：
  - (1)Model UV-1601，Shimadzu，日本。
  - (2)Model UV-160A，Shimadzu，日本。
- 7、紅外光光譜儀(Infrared Spectrophotometer, FT-IR)：Impact 400，Nicolet，美國。
- 8、熔點測定器(Melting Point Apparatus)：Yanaco MP-500D，資民，台北。
- 9、質譜儀(Mass Spectrophotometer)：VG Platform II GC-MS Instrument，美國。
- 10、高效液相層析儀(High-Performance Liquid Chromatography；HPLC)，裝置由下列組成：
  - A、Hitachi，日本：
    - (1)液相層析溶劑輸送系統 (Solvent Delivery Pump)：L-7100

- (2)紫外光可見光檢測器 (UV Detector) : L-7400
- (3)二極體列陣檢測器 (Diode Array Detector) : L-7455
- (4)自動注射器(Autosampler) : L7200
- (5)除氣系統 (Degasys) : DG-2410
- (6)層析管柱 : Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e column (4 X 250 mm, 5  $\mu$ m) , Merck , 德國。

B、Shimadizu , 日本 :

- (1)液相層析溶劑輸送系統 (Solvent Delivery Pump) : LC-10AS
  - (2)紫外光可見光檢測器 (UV Detector) : SPD-6AV
  - (3)積分儀 : (Integrator) : C-R6A
  - (4)層析管柱 : Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e column (4 X 250 mm, 5  $\mu$ m) , Merck , 德國。
- 11、酸鹼度計(pH meter) : Model 6071 , Jenco , 中華民國。
  - 12、超音波振盪器(Ultrasonic) : Transsonic-TP690 , Elma , 德國。
  - 13、可調式定量吸管 : Pipetman , 20、 200 及 1000  $\mu$ l , Gilson , 法國。
  - 14、水壓抽氣機(Aspirator) : Aspirator A-3S , Eylar , 日本。
  - 15、觸動式震盪器(Minishaker) : MS1 , IKA<sup>®</sup> Works(Asia) , 馬來西亞。
  - 16、冷凍箱 : 進信 , 台北。
  - 17、恆溫箱 : 進信 , 台北。
  - 18、自動取樣溶離試驗裝置(Dissolution tester) : Model DT-610 , Jasco , 日本。

19、收集器(Fraction Collector) : Model Dis-422 , Jasco , 日本。

## 二、材料與試藥

- 1、Huperzine A , Delta 天然化合物信息中心 , 安徽 , 大陸。
- 2、壓克力黏膠 , 新豐化工 , 台北。
- 3、穿山龍 , 漢強百草店 , 台中。
- 4、PVP K30(Polyvinylpyrrolidone ; PVP K30) , Sigma , 美國。
- 5、Plasdone K90 D(PVP K90 D) , ISP , 美國。
- 6、Pharmacoat 615(Hydroxypropyl Methylcellouse ; HPMC , USP Type 2910) , 信越化學 , 日本。
- 7、Metolose 90SH 15000(HPMC , USP Type 2208) , 信越化學 , 日本。
- 8、Metolose 90SH 4000 (HPMC , USP Type 2208) , 信越化學 , 日本。
- 9、Sodium Carboxymethylcellulose , Sigma , 美國。
- 10、Carbopol 940 , Merck , 德國。
- 11、Ethyl acetate , Merck , 德國。
- 12、Sodium hydroxide(NaOH) , Merck , 德國。
- 13、Disodium hydrogen phosphate( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) , Merck , 德國。
- 14、Potassium dihydrogen phosphate( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) , Merck , 德國。
- 15、Ortho-phosphoric acid 85% ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) , Merck , 德國。
- 16、Acetonitrile (ACN) , Merck , 德國。
- 17、Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) , Merck , 德國。

18、Hydrochloric acid 37 % (HCl) , Merck , 德國。

19、Potassium hydroxide (KOH) , Merck , 德國。

20、Triethylamine , Merck , 德國。

### 三、實驗方法

#### (一) Huperzine A 基本理化性質、分析方法及確效

##### 1、紫外光 – 可見光吸收光譜分析

以甲醇溶液作為溶劑，測定 huperzine A 紫外光 – 可見光吸收光譜圖。將 huperzine A 配製成 0.522、5.22、13.05、26.1、52.2  $\mu\text{g/ml}$  等五個不同濃度，觀察於不同的吸收波長下，其濃度與吸光值之關係。

##### 2、紅外光光譜分析

紅外光譜分析以溴化鉀 (KBr) 粉末為打片稀釋劑，取 huperzine A : KBr = 1 : 5 (w/w) 置於瑪瑙研鉢中研磨，並用幫浦抽氣加壓成薄片後，於 Impact 400 紅外光譜儀下測定其紅外光之吸收光譜，以鑑別其存在之官能基，光譜單位為  $\text{cm}^{-1}$ 。

##### 3、質譜分析

Huperzine A 之 EI Mass (Electron Impact Mass) 以 VG Platform II GC-MS Instrument 和 Shimadzu QP-1100EX 測定，電子化電壓為 70 eV，單位為  $m/z$ 。

#### 4、熔點測定

將熔點測定儀設定在 40-500 範圍，測定 huperzineA 開始融化至完全熔化的溫度。

#### 5、分析方法及確效

##### (1) 移動相的組成

移動相包含磷酸三乙胺緩衝液及 Acetonitrile，探討以不同比例的 Acetonitrile 含量，及固定 Acetonitrile 含量調整不同 pH 值當作移動相，討論其對滯留時間的影響。

##### (2) 標準曲線及範圍的建立

將 huperzine A 調配成 50、25、12.5、6.25、3.125、2.5、1.25  $\mu\text{g/ml}$  六個不同的濃度，利用已確效的層析系統進行分析。

##### (3) 精密度的測定

於同日，各製備高、中、低三種濃度(50、2.5、0.625  $\mu\text{g/ml}$ )之樣品，依已確立之分析方法進行可重複性及同日內精密度之測定。可重複性測定，將每一濃度試樣進行分析 6 次；同日內精密度之測定，將濃度高、中、低之樣品，分別於早、中、晚各測定三次，以評估本分析法之同日變異性。

於不同日，各製備高、中、低三種濃度(50、2.5、0.625  $\mu\text{g/ml}$ )之樣品，依已確立之分析方法進行測定，三種不同濃度試樣於早、

中、晚各測定三次，進行分析三個不同日期，以評估本分析法之異日變異性。

#### (4) 最低檢測濃度(LOD)與最低定量濃度(LOQ)試驗

最低檢測濃度試驗(Limit of Detection, LOD)是稀釋 huperzine A 至三種低濃度 0.025、0.0625、0.125、 $\mu\text{g/ml}$ ，以 HPLC 分析求得曲線下面積(Peak area)，依此法重複作三次，分別將此曲線下面積作線性迴歸，可得斜率(S)和截距。求出截距的標準差( $\sigma$ )，參照 ICH 內容計算求得最低檢測濃度( $\text{LOD}=3.3\times\sigma / S$ )與最低定量濃度(Limit of Quantitation,  $\text{LOQ}=\text{LOD}\times 3$ )。

#### (5) 安定性分析方法之評估

本研究採用高效液相層析法作為 huperzine A 安定性的分析方法評估。將 huperzine A 分別加入酸、鹼、中性及過氧化氫溶液，置於恆溫 60 及 80 環境下。取 huperzine A 之分解檢品作為建立分析方法專一性的試樣，並且以二極體列陣檢測器來確認層析峰之純度。

##### A、酸鹼效應之安定性研究用溶液製備

分別取鹽酸及氫氧化鉀溶液，以純水稀釋成 0.1 N，各以等體積加入 huperzine A 溶液中。配製完成之溶液置於經矽化之密封、阻光、Type 玻璃瓶中，並將各溶液置於 60 及 80 的恆溫箱中進行反應。取出零時間之樣品後，貯存於 -20 冷凍庫中。依各樣品安定性不同，取樣時間間隔由兩天至五天不等。

於反應時間達到後，將所收集的檢品自冷凍庫中取出，利用已確效之安定性分析條件，進行高效液相層析之分析。

#### B、含 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液之安定性研究用溶液製備

本實驗探討氧化劑催化對於 huperzine A 安定性之影響。其溶液之配製如下：取 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液，以純水稀釋成 6 %，以 1 : 1 比例混合配製成含 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之安定性研究用溶液。配製完成之溶液置於溫度 60 的恆溫箱中進行反應。依各樣品安定性不同，取樣時間間隔由三小時至十二小時不等，最長之取樣時間為二十七小時。

每次所取得的樣品利用已確效之安定性分析條件於高效液相層析儀中進行分析。

#### (6) 高效液相層析法之安定性分析條件：

- 1、層析柱：LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B column (4 x 250 mm) , Merck , 德國。
- 2、溫度：室溫
- 3、流速：1 ml/min
- 4、移動相：Acetonitrile : 磷酸三乙胺緩衝液 = 10 : 90 (含 0.05 M 磷酸及三乙胺 0.02 %)
- 5、注射量：20 µL
- 6、檢測條件：307nm

## (二)中草藥層析指紋圖譜之建立與確效

### 1、藥材取樣之前處理

樣品之前處理，除另有規定外，均依中華藥典第 5 版附錄第 93 頁所示的方法處理之。

### 2、萃取方式

將經基原鑑定之中草藥藥材，以粉碎機打成粉末，依上述之取樣方式前處理。精秤 1 g 粉末，置入 25 ml 樣品瓶中，加入 3 ml 70 % MeOH 水溶液後，超音波震盪 15 分鐘，以 1500 rpm 離心機離心 5 min，取上層液，殘渣再加入 8 ml 70 % MeOH 超音波震盪 15 分鐘，重複共三次。將三次的上層液合併，以 70 % MeOH 定容至 25 ml 作為檢測液。

### 3、測定條件

以高效液相層析儀搭配 Photodiode array 檢測器或 UV 檢測器，做為化學指紋圖譜測定之儀器。配製緩衝溶液及移動相，使用 C-18 層析管柱，化學指紋圖譜的波長。將上述檢測液，先以濾紙過濾，再經 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，取濾液 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相層析儀中，檢測其成分。

#### 4、分析條件

時間(分)	ACN ( %)	0.1 % 磷酸溶液 ( %)
0	0	100
10	10	90
35	15	85
70	25	75
80	40	60
90	55	45

#### 5、實驗內容

##### (1)層析指紋圖譜

以 HPLC 建立穿山龍之指紋層析圖譜，以選定各指紋層析峰出現之時間及相對時間。

##### (2)分析方法確效

依照已確立之分析方法進行測定，將每一藥材連續分析 6 次，連續分析 3 日，求得分析方法之變異。

##### (三) 水性配方之剝離強度(peeling strength)測定

本實驗水性配方之剝離強度測定，主要評估不同之配方對貼片與

皮膚之間的黏著性，對剝離力大小的影響。共使用 7 種不同之聚合物，提供藥物作為儲存室；配方中以聚合物作為變數，各聚合物分別依不同濃度及比例，與壓克力黏膠混合。

剝離強度測定以相同使用兩種不同方式：一是將壓克力黏膠與固定濃度之不同聚合物，以 1:1 1:3 三種不同比例混合，測定不同體積之聚合物製成的貼片黏性。二是將 7 種不同聚合物，各配製成 4 5 種不同濃度，再以 1:1 之固定比例與壓克力黏膠混合，測定相同體積下，不同濃度聚合物對貼片黏性之影響。

另外，選擇 3 種聚合物，加入中草藥—穿山龍乾萃取物製成貼片，測定乾萃取物對貼片黏性之影響。

各不同配方分別以手背部位皮膚和長玻璃片進行剝離強度測定，紀錄貼片完全撕下時的數值，評估貼片與皮膚之黏著性。

## 1、貼片製備

### (1) 1 % Carbopol 940

秤取 1 g 之 carbopol 940 於 90 ml 純水中，稍混合攪拌後，再以均質機打勻；另取 NaOH 0.4 g，以 10 ml 純水溶解，待完全溶解後，再將 NaOH 溶液緩緩加入 carbopol 940 中，繼續攪拌，調整酸鹼度至 pH = 7 左右，即得總重為 100 g 之 1% carbopol 940。

### (2) 其他聚合物

依照表 5 表 7 所列之配方，依不同百分比秤取聚合物，加水至 100 g，靜置數小時，待其吸水膨脹後，攪拌均勻，待用。

### (3) 壓克力黏膠

秤取壓克力黏膠 90 g，加入 45 g 乙酸乙酯，將其攪拌混合至呈均勻溶液狀，待用。

### (4) 貼片

A、取呈均勻狀之壓克力黏膠溶液與聚合物，分別以 1:1 1:3 不等之比例混合(如表 5)，充分混合後，利用塗膠器(高度為 1 mm)，將混合物塗開於不織布(支持層)上，置於 60 恆溫箱，經 2 小時烘乾後取出，即得水性貼片。

B、取呈均勻狀之壓克力黏膠溶液與聚合物，分別與不同濃度之聚合物(如表 6)，以 1:1 之固定比例混合，依 A 之方法製備貼片。

#### C、含穿山龍乾萃取物貼片

(a) 將穿山龍以粉碎機打成粉末，精秤 1g 粉末，加入 3 ml 70% MeOH 水溶液後，超音波震盪 15 分鐘，以 1500 rpm 離心機離心 15 min，取上層液，殘渣再加入 8 ml 70% MeOH 超音波震盪 15 分鐘，重複共三次，將三次的上清液合併，以 0.45  $\mu$ m 濾膜過濾，並乾燥至恆重，即得穿山龍乾萃取物。

表 5 不同配方之聚合物

Polymer	濃度(%)	比例 (壓克力膠 : polymer)
Metolose 90SH 15000	0.5%	1:1
		1:2
		1:3
	1%	1:1
		1:2
		1:3
Metolose 90SH 4000	0.5%	1:1
		1:2
		1:3
	1%	1:1
		1:2
		1:3
Sod. CMC.	1%	1:1
		1:2
		1:3
PVP K90D	10%	1:1
		1:2
		1:3
	20%	1:1
		1:2
		1:3

表 5 不同配方之聚合物(續)

Polymer	濃度(%)	比例 (壓克力膠 : polymer)
PVP K30	30%	1:1
		1:2
		1:3
Pharmacoat 615	4%	1:1
		1:2
		1:3
Carbopol	1%	1:1
		1:2
		1:3

表 6 不同濃度(%)polymer

polymer	濃度(%)	polymer	濃度(%)
Metolose 90SH 15000	0.5	HPMC	4
	0.8		5
	1		6
	1.5		8
	2		10
Metolose 90SH 4000	0.5	Sod. CMC	2.5
	1		3
	1.5		3.5
	2		4
PVP K30	25	Carbopol	0.5
	30		1
	35		1.5
	40		2
PVP K90 D	10		
	12		
	15		
	20		
	25		

(b) 選擇 3 種聚合物，加入水與穿山龍乾萃取物，並調整穿山龍濃度為 5%，如表 7，依 A 之方法製備貼片。

## 2、剝離強度測定

### (1)皮膚剝離強度

將貼片裁成寬 2 公分長 5 公分大小，平貼於手背皮膚上，並以 660 克之滾輪，以每分鐘 20 公分之速度滾壓 4 次。滾壓後，手放置在測定器左下方，並將遠離測定器一端之貼片撕開 0.5 公分，使其黏著面積為 9 平方公分，使用測定器上之夾頭夾住撕開部分，在夾頭另一端掛上重量。實驗開始時，因重量之增加使夾頭將貼片向 180° 相反方向撕開，直到貼片和皮膚完全分離時，記錄當時的重量，即為皮膚剝離力。

### (2)玻璃剝離強度

將貼片裁成寬 2 公分長 5 公分大小，平貼於寬 2 公分長 7.5 公分玻璃片上，並以 660 克之滾輪，以每分鐘 20 公分之速度滾壓 4 次。滾壓後，將玻璃片置於固定架上，並以夾頭固定玻璃片一端，將遠離

表 7 含 5%穿山龍乾萃取物之配方

polymer	polymer 濃度(%)
	0.5
Metolose 90SH	1
4000	1.5
	2
	1
HPMC	2
	4
	6
	2.5
Sod. CMC	3
	3.5
	4

測定器一端之貼片撕開 0.5 公分，使其黏著面積為 9 平方公分，並用測定器上之夾頭固定撕開部分，在夾頭另一端掛上重量。實驗開始時，因重量之增加使夾頭將貼片向 180° 相反方向撕開，直到貼片和玻璃完全分離時，記錄當時的重量，即為玻璃剝離力。

#### (四) 配方之溶離

##### 1、含 huperzine A 貼片之製備

精秤 6 mg 之 huperzine A，先以少量之甲醇溶解 huperzine A 後，再加入足量水，形成均勻之含藥溶液，依照表 8 所列之不同配方，將聚合物加入含藥溶液中，使其形成膠狀之含藥凝膠。

取壓克力膠溶液與含藥凝膠以 1:1 之比例均勻混合後，利用塗膠器(高度為 1 mm)，將混合物塗開於 15 x 24 cm 的不織布上，置於 60 恆溫箱，經 2 小時烘乾後取出，裁成 2x 4 cm 的貼片，每片含量為 1 mg huperzine A。

##### 2、溶離試驗方法之建立

###### (1) 溶離液配製

分別秤取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 g 及  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3010 g，加水定量至 1000 ml，即得 pH=7 之磷酸緩衝液(phosphate buffer)。

表 8 溶離試驗使用之配方

配方編號	Polymer	%
配方 1-1	Metolose 90SH 15000	0.5
配方 1-2		1.5
配方 1-3		3
配方 2-1	Metolose 90SH 4000	2
配方 2-2		3.5
配方 2-3		4
配方 3-1	PVP K90D	20
配方 3-2		25
配方 3-3		30
配方 4-1	PVP K30	30
配方 4-2		40
配方 4-3		45
配方 5-1	Pharmacoat 615	4
配方 5-2		6
配方 5-3		8
配方 6-1	Sod. CMC	2
配方 6-2		4
配方 6-3		6
配方 7-1	Carbopol 940	0.5
配方 7-2		1
配方 7-3		1.5

## (2) 溶離度試驗

本實驗依照美國藥典第 24 版溶離度試驗裝置 5 (paddle over disk) 作為溶離度的測定，如圖 5。水浴溫度保持於  $37 \pm 0.5$  ，轉速設定為 50 rpm。溶離液經由自動取樣裝置取樣，取樣時間由 5 分鐘至 6 小時不等，取樣之總時間為 13.75 小時。取得之樣品以 HPLC 系統在 307 nm 下進行分析。

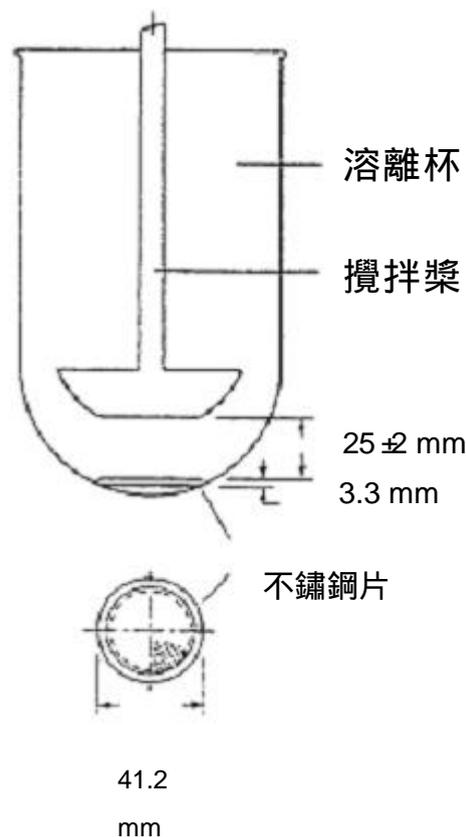


圖 5 美國藥典之溶離試驗裝置 5