

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNPH9603

計畫名稱：中草藥之藥物劑型設計與應用

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNPH9603

執行期間：96年1月1日至96年12月31日

計畫主持人：林恆弘

計畫參與人員：許立人、施美份、陳秋蘭

執行單位：藥學系

中華民國 97 年 3 月 31 日

摘要

草本植物抽提後乾燥之粉狀成分，未經特殊包裝則會出現吸濕性高與易腐敗等問題；本研究分兩部份，以繖形科植物南嶺前胡為模式藥物，針對其主成分進行藥理活性評估，並藉由處方與劑型設計加以克服保存上安定性欠佳之缺點；即中草藥成分採用藻酸鹽聚合體包覆經凍晶乾製成控制釋放圓粒，進一步探討製程因素對圓粒劑型理化性質、主成分安定性的影響。結果顯示，南嶺前胡萃取液對於UVB所引起之皮膚細胞的彈性蛋白(elastin protein)及前膠原蛋白(pro-collagen) mRNA 的抑制都呈現出不具明顯影響，在酪胺酸酶的活性分析中，南嶺前胡萃取液對酪胺酸酶的活性並沒有明顯影響。再則，將中草藥乾燥成分採用藻酸鹽聚合體包覆經凍晶乾製成的圓粒，可遮蔽中草藥成分不良的氣味，有效降低吸濕性，並具有對酸鹼感應之控制釋放的效果。

前言

南嶺前胡 (*Peucedanum longshengense* Shanet Sheh) 為多年生草本，根頸粗壯，存留多數枯鞘纖維，灰褐色，或淺棕色；根細長圓錐形，不分枝或有時分枝。莖圓柱形，髓部充實，有細條紋輕微突起，無毛或上部有極短毛，上部分枝。基生葉多數，具長柄。葉片輪廓為寬三角形，有呈3裂的，也有呈二回三出分裂的，頂端的3個裂片基部聯合，常下延，下面一對羽片具柄，其餘皆無柄，末回裂片為卵形或卵狀菱形，先端漸尖或急尖，基部呈楔形，圓形或截形，具鈍鋸齒或呈淺裂狀，邊緣稍厚，有短毛，上表面主脈上常有毛，下表面無毛，厚紙質；莖上部葉具短柄，葉片形狀與基生葉相同，較小。覆繖形花序分枝較多，花序梗上端密生粗毛；花柱短，彎曲，花柱基圓錐形。果實長圓形，分生果背部扁壓，長約6毫米，寬3毫米，背稜線形，尖銳突起，側稜呈翅狀，稜槽內有油管1-2，合生面油管4-6，油管稍粗大。胚乳腹面平直或微凹入。花期7-8月，果期8-9月。

南嶺前胡(*Peucedanum longshengense*)屬繖形科(Apiaceae)，於 1986 年被發現的一種新種¹⁾。分布於中國大陸廣西省北部及將西省南部，生長於 800~2100 公尺的山坡林緣路旁及山頂草叢中²⁾，近年台灣南部被引進栽培，民間應用於抗氧化及癌症治療。至 1997 年 P. Huang 研究發現其根部含有大量 khellactone 骨架化合物；(+)-pteryxin 及 D-mannitol 化合物³⁾。至目前為止，只有成功大學化學系吳天賞教授進行其葉部之成分分析⁴⁾，共分離得到 39 個化合物，其中 21 個屬 coumarins 類化合物，5 個屬 benzenoids 類化合物，3 個屬 sterols 類化合物，sesquiterpenoids、monterpenoids 及 alkaloids 類化合物各 2 個，lignanoid、flavonoid 類化合物各 1 個及 erythritol 等。南嶺前胡之藥理活性研究尚無文獻報導。

前胡屬植物已知有 48 種被研究其化學成分及藥理作用，此屬植物之成分類屬有 Coumarins、Chromones、Flavonoids、Benzenoids、Terpenoids、Sterols 及少量 Alkaloids 等。前胡屬植物近代之藥理研究具有抗微生物作用、抗癌、抗血小板凝集、抗高血壓、抗過敏、抗氧化、抗發炎、抗糖尿病及鎮咳等作用。而南嶺前胡植物至今只有 P. Huang 及吳天賞教授分離其葉部成分，其藥理活性試驗至今尚未有文獻報告。故本植物極具開發價值，今結合本校藥物科技研究所及藥學系在成分分析、藥理學及藥劑學等的資深教師，將南嶺前胡植物由其組織基原鑑定、活性成分分析、藥理活性、毒理及將活性成分製備成適用劑型等，作一系列整合型研究，並將研究結果提供未來在開發本植物各項產品之依據。

此外，中草藥熱潮與全球草藥產品市場正持續大幅成長，預估到 2006 年，全球中草藥市場將突破 350 億美元；如何把握中草藥之品質及開發中草藥與其相關產品，以提高中草藥產值，已成為國內產、學、研各界積極研究的課題。國內中草藥可區分為科學濃縮製劑，以及傳統的飲片和傳統劑型，除飲片外，方便使用最常見的劑型仍屬散劑，而散劑中草藥易吸濕、易發霉、難計量以及如何確保民眾用藥安全等問題，為強化中草藥現代化，並帶動傳統中草藥加值，有利進入國際市場，仍有待劑型研究來改善。早期的丸劑是圓粒劑型的開端，自 1949 年以後才獲得製造技術上的突破，逐漸將粒徑改小，同時研發出多種處方的圓粒劑型；隨後由於製造機器的不斷進步，使圓粒控釋劑型也因此隨之興起⁹⁻¹¹⁾。圓粒劑型口服後可迅速分散於消化道中，不但能提高製劑之接觸面積，避免藥物吸收受阻；在不影響藥物生體可用率的情況下，亦可減少血中藥物濃度的劇幅變化，降低可

能之藥物副作用。其次，使用圓粒劑型能減少胃排空時間與總通透時間的差異性，使個體間和個體內的血中濃度的差異度降至最低，而圓粒劑型的多體特性，則可避免因藥物全釋所造成的局部藥物高濃度，產生對消化道管壁的刺激與傷害。就圓粒控釋劑型而言，藉由處方與包覆膜衣⁽¹²⁻¹⁴⁾的選擇，可有效控制藥物的釋出速率；另外，目前已有將不同藥物的圓粒混合在同一劑型中，而這些藥物可以是化學不相配合的，也可以是同一劑型中包含數種不同釋出速率之同一藥物圓粒，藉此將藥物輸送至消化道內之特定吸收部位。由於圓粒劑型之多樣化設計及其與生俱有的特點，可符合改善藥物療效和提高安全性的目標，自研發以來，在製藥界即快速佔有一席之地。

實驗方法

一、活性評估：

組織基原鑑定部分：由於南嶺前胡屬新品種，其植物組織鑑定未曾有文獻報告，故本子計畫首對本植物之根莖葉各部位，利用組織切片，建立其組織鑑定圖譜。

成分分析部份：於3月南嶺前胡(*Peucedanum longshengense*)花期，採集其花蕾，經剪碎後稱重，以95%EtOH浸泡3個月，過濾，收集濾液，經減壓濃縮至乾，稱重。預留5g作為預試驗及活性評估試驗用。將餘量提供給子計畫(二)及(三)進行藥理及藥劑學等試驗。

其餘EtOH萃取物再以H₂O及CH₂Cl₂等溶媒進行分配萃取，即得H₂O及CH₂Cl₂層等各萃取層。各萃取層也依各分配萃取層之極性，先進行粗分成幾個Fraction。各Fraction再依其極性大小，選擇適當層析材質，分別進行順相或逆相管柱層析、薄層層析及製備型高效液相層析，進行成分分離、純化及構造決定。所得純化物再利用UV、IR、¹HNMR及MS等光譜分析決定其構造式。

功效評估部分：將 EtOH 萃取物、H₂O 及 CH₂Cl₂ 各萃取層先取少量分別進行 Trolox 當量總抗氧化能力試驗、清除 DPPH 自由基試驗及對 U937 細胞毒性試驗及有效成分促進 U937 細胞吞噬 *Klebsiella pneumoniae* -gfp(肺炎桿菌)試驗。

Trolox 當量總抗氧化能力試驗⁵⁾及清除 DPPH 自由基試驗⁶⁾，主要評估本植物之各萃取層之抗氧化供氫能力。Trolox 當量總抗氧化能力試驗主要利用 ABTS 與 peroxidase 及 H₂O₂ 反應產生 ABTS⁺，此為一相當穩定之藍綠色物質，於 734nm 波長下具有吸收，抗氧化劑(本植物之各萃取層稀釋溶液)之加入會抑制此顏色的產生，既吸光值愈低，樣品抗氧化效果愈佳。DPPH 之 EtOH 溶液在 517nm 下會有強吸光，若被抗氧化劑(本植物之各萃取層稀釋溶液)還原時，則吸光值降低，即在 517nm 的吸光值越低，表示抗氧化劑的供氫能力越強。

細胞毒性試驗以 Cell Counting Kit-8⁷⁾方法進行對 U937(類人類巨噬細胞)細胞毒性試驗，選擇對 U937 細胞無毒之萃取層，再進行促進 U937 細胞吞噬 *Klebsiella pneumoniae* -gfp(肺炎桿菌)試驗。篩選出具促進 U937 細胞吞噬肺炎桿菌有效之萃取層，並以此為篩選平台，進行有效成分之分析。

胺酸酶的活性測試⁸⁾ (tyrosinase activity assay) 是採用 *in vitro* 的方式，在 96 孔洞培養皿中，於每個孔洞中加入 70 μ l 的 HBSS、10 μ l 各種不同濃度的試劑或酪梨萃取液，及 10 μ l 之 12U 酪胺酸酶，放入 37 °C 培養箱中反應 30 分鐘，然後再加入 10 μ l 的 10mM L-dopa，繼續放入培養箱中反應 30 分鐘，採用 492 nm 的波長來測吸光值的變化量。

二、圓粒製備：

將中草藥粹取液、明膠溶液、PEG400、Tween80、PEG600 溶液、甘油等以

適當比例混合，以氯化鈣溶液為固化液，由下方裝置製成圓粒，再經由凍晶乾燥製成乾燥圓粒備用，進一步探討包埋率、吸濕性與安定性等性質。



結果與討論

結果：

UVB 明顯抑制 elastin 的產生，然而南嶺前胡萃取液對於 UVB-inhibited Elastin protein 之作用（如圖 1a 及 1b 所示）並無明顯緩和之作用。UVB-inhibited Pro-collagne mRNA 也出現同樣的結果：南嶺前胡萃取液對於也無明顯之作用如圖 2a 及 2b 所示。

Figure 1a 南嶺前胡萃取液對於 UVB-inhibited Elastin protein 之作用
Elastin (65KDa)

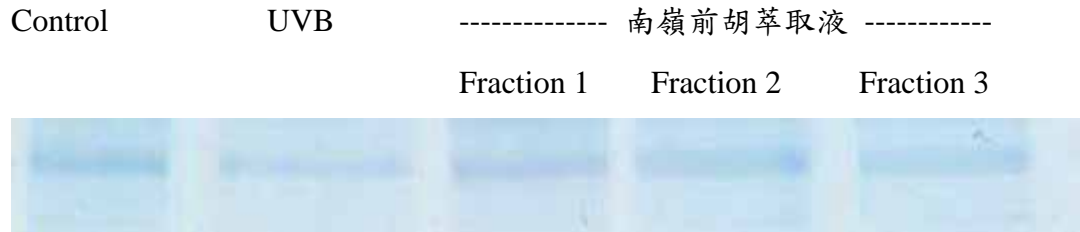


Figure 1b
Internal control (α -tubulin, 56KDa)



Figure 2a. 南嶺前胡萃取液對於 UVB-inhibited Pro-collagne mRNA 之作用

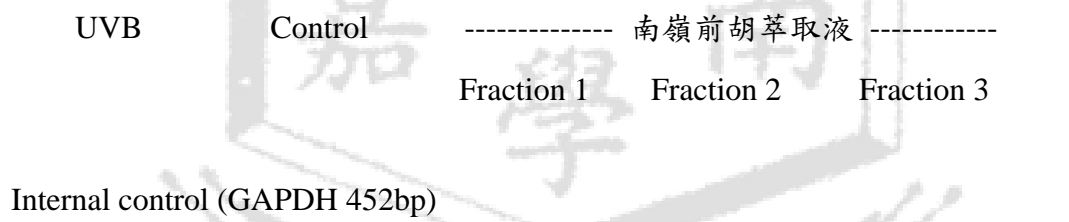


Figure 2b
Pro-collagen (225bp)

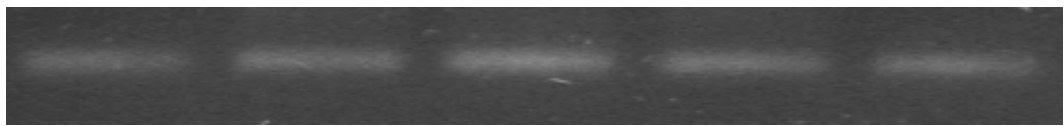


Figure 3. 圓粒成品

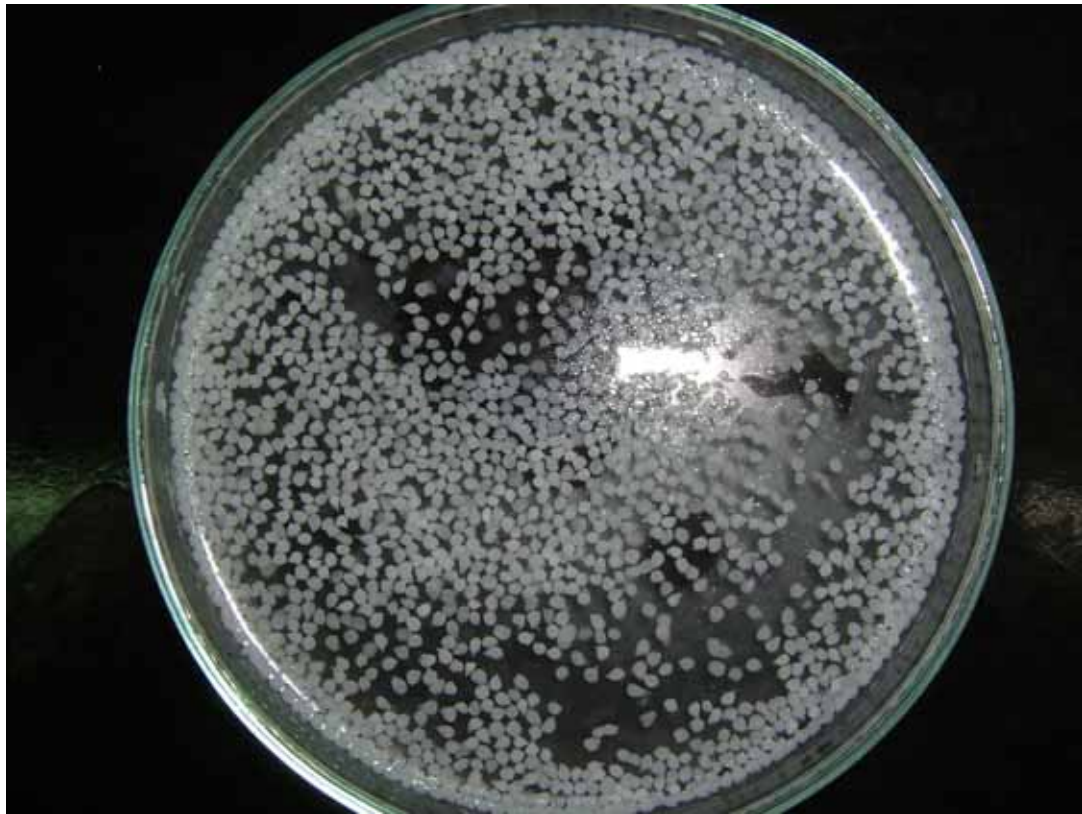


Figure 4. 不同處方之圓粒包埋率

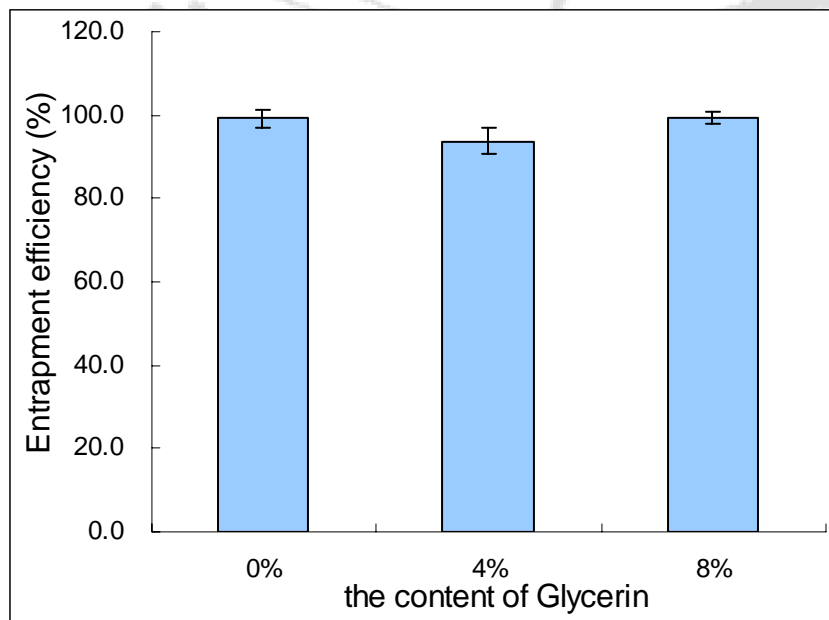
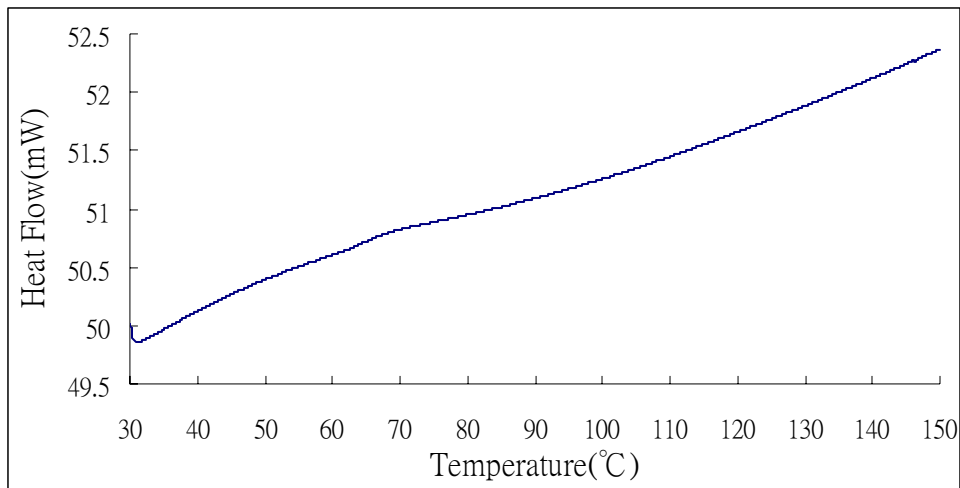


Figure 5. 圓粒成品之熱分析圖



討論：

南嶺前胡萃取液對於 UVB 所引起之皮膚細胞的彈性蛋白(elastin protein)及膠原蛋白(pro-collagen) mRNA 的抑制都顯現出不具明顯影響之意義，因為並無任何有關南嶺前胡作用在抗皮膚老化之前例，因此推論可能須改變研究方向，如探討南嶺前胡萃取液是否對 MMP 或 TIMP 的活性有影響。

在酪胺酸酶的活性分析中，南嶺前胡萃取液對酪胺酸酶的活性並沒有明顯影響，因此對美白的活性並沒有影響。

改變製程與配方可控制圓粒的粒徑大小，主成分的包埋率可高達 100%，熱分析的結果顯示乾燥圓粒在貯存過程並未有明顯的吸濕現象，而主成分的釋離則與周圍環境的 pH 值有關。

參考文獻

- 1) Shan, R. H., Shen, M. L., Wang, T. S., Pu, F. T., Shen, K. M., Chang, H. T., "New taxa of the Chinese Umbelliferae", *Acta Phytotaxonomica Sinica*, **26**, p.304~3117, 1986.
- 2) Shan, R. H., Shen, M. L., Wang, T. S., Pu, F. T., Shen, K. M., Chang, H. T., "New taxa of the Chinese Umbelliferae", *Acta Phytotaxonomica Sinica*, **24**, p.306~307, 1986.
- 3) Huang, P., Zheng, X. Z., Nishi, M., Nakanishi, T., "Isolation and structure elucidation of longshengensin A from *Peucedanum longshengense*.", *Yaoxue Xuebao*, **32**, p.62~64, 1997.
- 4) 高安平, "南嶺前胡葉部與廣東山葡萄之成分研究", 國立成功大學化學研究所碩士論文, 中華民國 95 年。
- 5) H. M. Yu, B. S. Wang, S. C. Huang, and P. D. Duh, "Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative", *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3132~3138, 2006.
- 6) H. L. Chuang, X. L. Lee, and T. C. Huang, "Extracts of Tsarm Yung Chung Tsao which exhibit remarkably antioxidative and free-radical scavenging activities", *J. of Taiwan Normal University Mathematics, Science & Technology*, **48**(1,2), 13-24, 2003.
- 7) Jiao H, Soejima Y, Ohe Y, Saijo NA. A new MTT assay for examining the cytotoxicity of activated macrophages towards the nonadherent P388 leukemia cell line. *J. Immunol. Methods*, **153**: 265-266, 1992

- 8) Choi, S. Y., Kim, S., Kim, H., Suk, K., Hwang, J. S., Lee, B. G., Kim, A. J., and Kim, S. Y. (4-Methoxy-benzylidene)-(3-methoxy-phenyl)-amine, a nitrogen analog of stibene as a potent inhibitor of melanin production. *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 450-452, 220.
- 9) Chatchawalsaisin J, Podczec F, Newton JM., The preparation by extrusion/spheronization and the properties of pellets containing drugs, microcrystalline cellulose and glyceryl monostearate. *Eur J Pharm Sci.* 2005 Jan;24(1):35-48
- 10) Basit AW, Newton JM, Lacey LF., Formulation of ranitidine pellets by extrusion-spheronization with little or no microcrystalline cellulose. *Pharm Dev Technol.* 1999;4(4):499-505
- 11) Jover I, Podczec F, Newton M., Evaluation, by a statistically designed experiment, of an experimental grade of microcrystalline cellulose, Avicel 955, as a technology to aid the production of pellets with high drug loading. *J Pharm Sci.* 1996 Jul;85(7):700-5.
- 12) Guthmann C, Lipp R, Wagner T, Kranz H., Development of a multiple unit pellet formulation for a weakly basic drug. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007 Mar;33(3):341-9.
- 13) Nimkulrat S, Suchiva K, Phinyocheep P, Puttipipatkachorn S. Influence of selected surfactants on the tackiness of acrylic polymer films. *Int J Pharm.* 2004 Dec 9;287(1-2):27-37
- 14) Siew LF, Basit AW, Newton JM., The potential of organic-based amylose-ethylcellulose film coatings as oral colon-specific drug delivery systems. *AAPS PharmSciTech.* 2000 Jul 23;1(3):E22.

