

計畫編號：DOH89-TD-1121

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度  
科技研究發展計畫

以體外穿皮方法及體內非侵入性皮膚檢測儀器評估市售含純粹辣椒素軟膏製劑之品質

研究報告

執行機構：台北醫學院

計畫主持人：方嘉佑

研究人員：王瑩玉

執行期間：88年7月1日至89年6月31日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

摘要

Abstract

前言

一、研究問題之背景

(一) 番椒晶素的發現與發展

(二) 藥物資訊

2-1 物理化學性質

(a)NVA 之物理化學性質-

2-2 藥理性質

(a)抗傷痛作用(Antinociceptive acitivity) -

(b)降血壓作用(hypotensive effect) -

(c)降血脂作用(hypolipidemia effect) -

(d)抗發炎作用(antiinflammatory effect) -

(三) 經皮輸藥系統之簡介(Trnasdermal Drug Delivery System)

3-1 定義

3-2 皮膚特性

3-3 原理

3-4 經皮輸藥系統

二、現況

三、研究目的

材料與方法

一、材料

(一) 試劑與醫材、藥品

1-1 Capsaicin 市售產品

1-2 自製產品需用藥品

(二) 溶媒配製

2-1 自製處方 pH4 溶媒

2-2 體外釋出實驗與 HPLC 分析檢品稀釋 pH7.4 溶媒

(三) 自製處方

(四) 處方配製

4-1 配製原則

4-2 配製方法

(五)儀器設備

二、方法

(一) 軟膏性質測定

1-1. 軟膏粘稠度之測定

(二) 體外釋出實驗

### (三) 體內實驗-角質層藥物含量測定

3-1 體內實驗步驟 (包括角質層藥物含量測定檢品收集、皮膚紅斑記錄、自覺症狀記錄)

3-2 角質層藥物含量檢品前處理

3-3 角質層藥物含量測定 - HPLC 分析

(a) 檢量線

(b) 分析條件

### (四) 體內實驗-皮膚色差測定

4-1 測定原理

4-2 測定方法

## 結果和討論

### 一、結果和討論

#### (一) 體外評估

1-1 體外評估市售霜劑

1-2 體外評估 Pluronic 水性凝膠

1-3 體外評估聚甲殼糖 (Chitosan) 水性凝膠

1-4 體外評估 CMC 水性凝膠

#### (二) 體內評估

2-1 皮膚剝片 (Skin strippings)

2-2 皮膚紅斑測試 (Skin erythema)

## 參考文獻

## 圖次

圖一 Capsaicin, NVA 化學結構式

圖二 皮膚之剖面圖

圖三 體外穿透試驗裝置之藥物濃度梯度

圖四 體外穿透試驗直式裝置

圖五 Zostrix<sup>®</sup> 等市售處方之穿透速率(A)及釋出速率(B)

圖六 Benejoint<sup>®</sup> 等市售處方之穿透速率(A)及釋出速率(B)

圖七 Pluronic 20-30% 之穿透速率(A)及釋出速率(B)

圖八 Chitosan 之穿透速率(A)及釋出速率(B)

圖九 CMCNa, CMCNH<sub>4</sub> 之穿透速率(A)及釋出速率(B)

圖十 CMCNa + Chitosan 之穿透速率(A)及釋出速率(B)

圖十一 Capsaicin 不同濃度之穿透速率(A)及釋出速率(B)

圖十二 Skin strippings - Capsaicin 及 nonivamide 於角質層之累積量

圖十三 Skin erythema - Zostrix<sup>®</sup> 等市售處方投與一小時之發紅現象

圖十四 Skin erythema - Zostrix<sup>®</sup> 等市售處方投與四小時之發紅

現象

圖十五 Skin erythema – CMCNa 水性凝膠投與一小時之發紅現象

圖十六 Skin erythema – CMCNa 水性凝膠投與四小時之發紅現象

表一 自製水性凝膠處方內容

表二 所有處方之黏度、穿透速率及釋出速率

表三 自覺反應

## 摘要

於此研究中探討自製水性凝膠中辣椒素和 nonivamide 體外及體內經由皮膚的吸收，另外也評估市售辣椒霜劑(cream)，以便與水性凝膠相互比較。皮膚剝片技術 Mexameter 則用以評估角質層中藥物含量，及體內吸收的辣椒素所引起的皮膚紅斑效應。

研究結果顯示藥物在皮膚及水性凝膠基質之間的分配(partitioning)，似乎在穿透皮膚過程中佔有重要角色。由水性凝膠釋出的辣椒素之體外穿透皮膚能力，發現視所使用聚合物的物化性與濃度而定。水性凝膠中加入非離子性的 pluronic 高分子聚合物會造成辣椒素的釋出阻延。另一方面，在體外辣椒素的皮膚穿透能力，陽離子的聚甲殼糖(chitosan)水性凝膠及陰離子的 carboxymethyl cellulose (CMC)水性凝膠，都比霜劑基劑為高。Nonivamide 的皮膚穿透，在體外試驗發現是在塗敷的後期，有阻礙吸收效應。體內研究的個體間差異比在體內皮膚穿透試驗中顯著。霜劑在體內誘發的皮膚紅斑現象視藥物濃度而定，但在水性凝膠中則並未觀察到此濃度相關性(dose-dependency)。塗敷 nonivamide 的皮膚出現紅斑較塗敷辣椒素強烈。此研究成果指出：局部塗敷辣椒素和 nonivamide 時，體外的皮膚穿透能力和體內的紅斑反應間有一定的相關性，同時也看到體內試驗中，角質層中藥物含量和皮膚紅斑試驗間有相關性發

現。

關鍵詞：辣椒素、Nonivamide、局部塗敷、皮膚、水化凝膠

## Abstract

The in vitro and in vivo skin absorption of capsaicin and nonivamide from hydrogels is investigated in this study. The commercial creams of capsaicin was also evaluated to compare with hydrogels. Both skin stripping technique and Mexameter<sup>®</sup> were used to evaluate the drug retained in stratum corneum (SC) and skin erythema of in vivo capsaicin and nonivamide absorption. The partition of drug between skin and the hydrogel matrix seems to play an important role in the permeation process. The in vitro permeation of capsaicin from hydrogels depends on the physicochemical nature and the concentration of the polymer used. The incorporation of nonionic Pluronic F-127 polymer into hydrogels resulted in a retarded release of capsaicin. On the other hand, the in vitro capsaicin permeation showed higher levels in cationic chitosan and anionic carboxymethyl cellulose (CMC) hydrogels than cream bases. The permeation of nonivamide was retarded at the late stage of in vitro application. The inter-subject variation was more significant in the in vivo study than in vitro skin permeation experiments. The creams induced in vivo skin erythema depending on the drug concentration, however, the dose-dependency was not observed in hydrogels. Nonivamide-treated skin showed stronger erythema than capsaicin-treated skin. The present study indicates that there is a moderate correlation between in vitro skin permeation and in vivo erythema responses of topically applied capsaicin and nonivamide. The correlation between drug amount in SC and skin erythema test in vivo was also observed.

Keywords: capsaicin; nonivamide; topical application; skin; hydrogels

## 前言

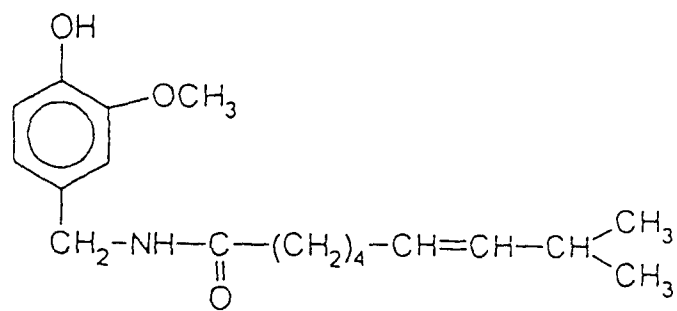
### 一、研究問題之背景

#### (一) 番椒晶素的發現與發展

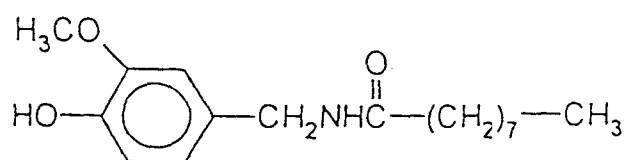
番椒晶素(capsaicin)(圖一)是茄科番椒屬植物如 *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum minimum* 等之果實中的主要辛辣成分 (Juhasz and Tyirak, 1969), 其含量約佔 0.1-1%(Monsereenusorn et al., 1982)。番椒晶素於古代便已被應用為食品添加劑及作為治療癢、痛及便秘之生藥(Buck and Burks, 1986)。第一位分離出 capsaicin 的學者為 Thresh, 他在 1876 年時便由番椒屬植物中萃取分離出辛辣成分, 並命名為 capsaicin, 但是其分子式仍然不清楚。直到 1898 年 Micko 改善抽取分離 capsaicin 的方法並訂出其分子式為  $C_{18}H_{27}NO_3$ (Nelson, 1919)。到了 1923 年時 Nelson 才完全確定其結構式為  $\Delta^6$ , -8methyl-nonenyl vanillyl amide (Nelson and Dawson, 1923)。目前其於 IUPAC 的命名 8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide。

有學者以 capsaicin 為藍本用合成的方法得到 capsaicin 的同類物 - Nonanoyl vanillylamide (nonivamide) (Nelson, 1919) (圖一), 其分子式為  $C_{17}H_{27}NO_3$ , 別名為 N-Pelagonyl vanillylamide。而從研究報告中得知 nonivamide 與 capsaicin 之藥理活性有許多相類似之處(Toh et al., 1954; Northan and Jones, 1984; Bucsecs and Lembeck, 1987)。capsaicin





CAPSAICIN



Nonivamide : nonanoyl-vanillylamide

圖一 Capsaicin, NVA 化學結構式

之同類物中如 vanillyl acylamides, homovanillyl acylamides, carbamate derivatives, alkyl aralkanamides 等，在對其辛辣強度、脫敏作用 (desensitizing effect) 和抗傷痛作用 (antinociceptive activity) 上的比較，發現其強度均比 capsaicin 小，而且只有 nonivamide 之藥理作用與 capsaicin 最為類似 (Szocsanyi and Jancso-Gabor, 1975; Hayes et al., 1984)。

由許多藥理研究結果顯示 capsaicin 呈現很強烈的刺激作用與神經毒性，在稀釋成 1/8000mg 之後仍具有非常強勁的辛辣感 (Szocsanyi and Jancso-Gabor, 1975; Monsereenusorn et al., 1982; Buck and Burks, 1986)，而且其對水的溶解度不佳，使得 capsaicin 在臨床上的應用存許多限制。因此必須將其神經毒性減弱，提高其親水性，即將其結構式加以修飾以增加其於臨床上之應用。1919 年 Nelson 以 capsaicin 之碳數作比較，發現當碳數增加或減少皆會減低其辛辣程度，而且也會隨著水溶性的增加而減弱其辛辣程度 (Nelson, 1919)。另外在 1955 年 Toh 進一步證明 alkyl 鍵與藥理活性有密切的關連，如果移除 alkyl 鍵形成 vanillylamide，則辛辣作用會消失且其藥理作用也會降低 (Toh et al., 1954; Northan and Jones, 1984)。現今應用於止痛作用的 capsaicin 同類物皆是應用此原理。另外在 capsaicin 的苯環上之 3-OCH<sub>3</sub>、4-OH 取代基也同樣扮演很重要的角色，特別是置換 phenolic OH 基，將會導

致辛辣性完全的喪失，可見 capsaicin 是一種結構專一的化合物(Jones and Pyman, 1925; Fuji et al., 1986)。

## (二) 藥物資訊

### 2-1 物理化學性質

(a)NVA 之物理化學性質-

Nonivamide (Nonanoyl vanillylamide),  $C_{17}H_{27}NO_3$ , 別名為 N-Pelargonyl vanillylamide, 為淡黃色粉末，融點為 42-45°C 之間，微溶於冷水，易溶於熱水及酒精、乙醚、氯仿等有機溶劑內。其 TLC spot 的 Rf 值為 0.83( $CH_3OH:CH_2Cl_2 = 3:7$ )，紫外線吸收光譜為  $U_{vmax}$  (MeOH): 227, 276nm (Chen et al., 1992)。螢光吸收則為  $Fluomax$  (MeOH):  $Ex = 252.6nm$ ,  $Em = 311.6nm$ 。

### 2-2 藥理性質

Nonivamide 為 Capsaicin 同類物，一般而言藥理性質皆大同小異。

(a) 抗傷痛作用(Antinociceptive activity) –

Capsaicin 已被證實對動物具有止痛作用 (Gamse, 1982; Lahann and Farmer, 1982)。當全身性投與 Capsaicin 後，脊髓內的 substance P (SP) 會明顯的減少，而於大腦內則否(Gasparovic et al., 1964)。Substance P 與脊髓的背角(dorsal horn)之痛覺傳導有密切的關連。用來評估痛覺感

受性之方法最主要是以熱、化學物質、壓力等三種刺激物來評斷(Hayes et al., 1981)。若連續給予 Capsaicin 2-3 個月後，顯示會升高對壓力及化學物質的痛閾(threshold)，但是對於熱的痛閾則並沒有顯著的增加。(Hayes et al., 1980)

(b)降血壓作用(hypotensive effect) –

靜脈注射 NVA 於 Wistar 係大白鼠，其血壓隨著時間呈現三相反應，並且心跳會減慢且呼吸困難(Makara et al., 1967)。三相反應分別為：血壓短暫且快速下降 (effect A)，回升到正常或微升 (effect B)，沿後下降 (effect C)。至於 SNA 施與靜脈注射後血壓僅出現單相的降壓反應，而且心跳及呼吸的影響並不明顯。然而若施以動脈注射 Capsaicin, NVA 及 SNA 對血壓都是呈現單相降壓作用，比較三者的藥效強度分別為 Capsaicin> NVA>SNA (Chen et al., 1992)。

(c)降血脂作用(hypolipidemia effect) –

近幾年來的研究發現，Capsaicin 可以提高血中的 hormone sensitive lipase (HSL) 之活性，並且可以抑制脂肪組織中鈣和 calmodulin-dependent cAMP phosphodiesterase 的活性，因此促進脂肪分解而降低血脂肪量(Negulesco et al., 1987; Salimath and Satyanarayana, 1987)。另外 Capsaicin 也顯示對血小板凝集有顯著的抑制作用 (Wang et al.,

1984)。

(d)抗發炎作用(antiinflammatory effect) -

組織胺若皮下注射 (histamine)在正常的人體皮膚上，則皮膚會產生 axon reflex vasodilation (flare)，水腫所引起的小膿皰(wheal)及刺癢感(itch) (Bernstein et al., 1981; Toth-Kasa et al., 1986)。若以 Capsaicin 類藥物局部塗抹於皮膚上，則 flare 及刺癢感會顯著地降低甚至消失，但是對小膿皰並沒有影響(Foreman et al., 1983; McCusker et al., 1989; Bjerring and Arendt-Nielsen, 1990)。另外如 somatostatin, substance P, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 等引起的 flare 及刺癢感的發炎作用也都可以經由局部投與此類藥物而有明顯的改善效果(Anand et al., 1983; Jancso et al., 1985; Wallengren and Moller, 1986; Izumi and Karita, 1988; Szocsanyi, 1988)。

### (三) 經皮輸藥系統之簡介(Trnasdermal Drug Delivery System)

#### 3-1 定義

所謂藥物傳輸系統(Drug Delivery System)是利用各種載體以適當的方法和用藥途徑將藥物有效地送入體內，以達到治療效果。而經皮輸藥系統則是一種可控制的輸藥系統，能持續的控制藥物釋出到達皮膚的表皮，藥物經穿透表皮後進入微血管，再經循環系統到達治療標的區

以達到療效。其最大的優點便在於使用方便，施用於皮膚上可隨時停止用藥，不致於發生藥物快速大量釋出的危險。一位正常的成年人其皮膚總面積約為  $2\text{m}^2$  左右，而微血管之血流量約佔全身血流量之三分之一，因此經皮輸藥系統是一種極富潛力的給藥途徑 (Chien, 1983)。

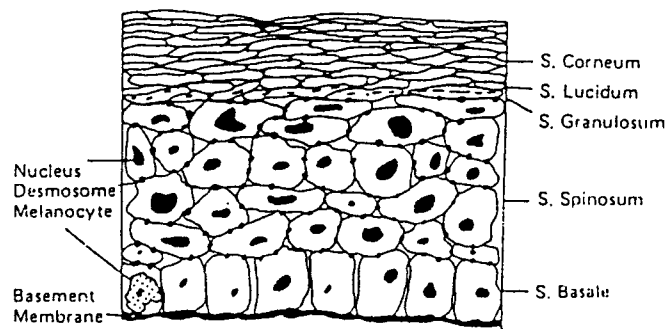
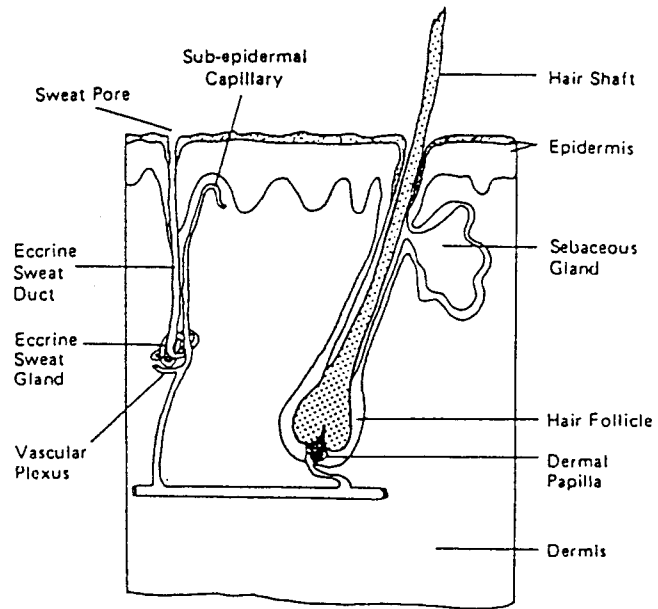
### 3-2 皮膚特性

人體皮膚的結構大致上可以分為表皮(epidermis)、真皮(dermis)及皮下組織(hypodermis)三層(圖二)，而表皮層的最外層為角質層(stratum corneum)所覆蓋，角質層為多層排列緊密、含水量少、低活性的角質化細胞所構成。此角質層通常是藥物穿透皮膚時最大的障礙區域，而這也是發展經皮輸藥系統最需要突破的瓶頸 (Chien, 1984)。

藥物穿透皮膚的途徑最主要可分為下列五種方式(Kligman, 1983)：

1. 直接穿透角質層
2. 經由細胞間隙穿透
3. 經由汗腺穿透
4. 經由毛囊穿透
5. 經由皮脂腺穿透

上述的五種途徑，以後面三者之穿透速率較快速，但汗腺、毛囊及皮脂腺僅佔皮膚總面積的 0.1%，因此藥物穿透皮膚之途徑以前二



圖二—皮膚之剖面圖

者為主。

### 3-3 原理

至於藥物對皮膚的穿透原理，可以用 Fick's law 說明，由物質穿透薄膜（半透膜）的方式來加以解釋（圖三）。若薄膜的面積與厚度分別為 A 及 h，薄膜置於兩個腔室之間，左邊含有藥物稱為施藥端（Donor site），右邊實驗時初為不含藥物之溶液為受藥端(Receptor site)，藥物可由施藥端穿透薄膜而達到受藥端，經過了一段時間後而達到穩定狀態(steady state)。

假設施藥端及受藥端的濃度分別為  $C_a$  及  $C_b$ ，薄膜近施藥端及受藥端的濃度分別為  $C_{ma}$  及  $C_{mb}$ ，則此時單位時間內穿透的藥量可依 Fick's first law 來加以說明：

$$J = dQ/dt = DA(C_{ma}-C_{mb})/h \dots\dots\dots(1)$$

J 為流通量，D 為擴散係數，A 為穿透之面積，h 為薄膜之厚度。

若設 K 為藥物在薄膜兩水溶液間的分配係數，則：

$$C_{ma} = K C_a \dots\dots\dots(2)$$

$$C_{mb} = K C_b \dots\dots\dots(3)$$

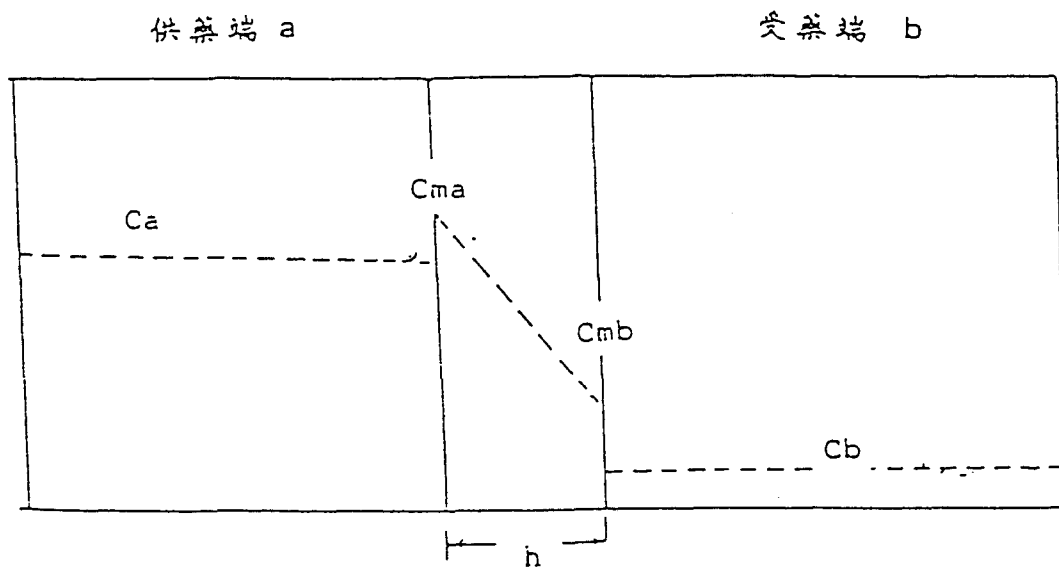
$$DQ/dt = DKA(C_a-C_b)/h \dots\dots\dots(4)$$

但是擴散係數 D 與分配係數 K 之數值不易得到，故將 D、K 及 h

合併即得穿透係數 P:

$$P = DK/h \dots\dots\dots(5)$$





圖三—體外穿透試驗裝置之藥物濃度梯度

受藥端的藥物濃度若控制成 Sink condition，也就是  $C_a \gg C_b$ ，則

可得下列公式：

$$dQ/dt = PACa \dots\dots\dots(6)$$

$$Q = PACat \dots\dots\dots(7)$$

以藥物之累積量對時間作圖，可得一斜率為  $PACa$  的直線，利用此直線的斜率可求得藥物的穿透係數  $P$ 。穿透係數的值代表藥物穿透薄膜的能力。

### 3-4 經皮輸藥系統

經皮輸藥系統最主要的優點為(Karim, 1983):

1. 吸收不經胃腸道及肝臟，因此可以適用於高首渡效應或對胃腸道產生不適的藥物。
2. 血中濃度變化較小，可是用於療效指數較窄的藥物。
3. 易除去，可停止藥物再進入體內，可避免藥物大量且快速釋出被吸收的危險性。
4. 給藥次數減少，半夜不需起床服藥。
5. 用藥方便，病人較願意合作。

但是經皮輸藥系統也有幾項缺點：

1. 一般藥物穿透皮膚困難，僅有少數穿透性良好，且劑量小藥效強的藥物才較適用於經皮輸藥方式。

2. 皮膚易發生過敏反應。

3. 價格較貴。

經皮輸藥系統 (transdermal drug delivery system, TDDS) 是為軟膏或貼片製劑施用於皮膚產生全身性療效用，以改進口服或其他投與方法之缺點的劑型。因為藥物經皮吸收的量十分有限，所以目前市面上所販售的已開發經皮吸收產生全身性療效的藥物，通常仍舊是以劑量小的藥物為主，如 Clonidine, Scopolamine, Nitroglycerine 和 Estradiol 等。另外市售凝膠型軟膏如 Etofenamate, Flufenamic 及 Niflumic acid 等非類固醇類抗炎劑，由於劑量較大，雖屬於經皮吸收軟膏，但使用上仍以塗服於患部以產生局部作用為主。

## 二、現況

至於 Capsaicin 作為軟膏劑使用之報告很早便有發表，這種從辣椒所被抽取誘導出來的生物鹼製成軟膏後，局部塗抹後對於治療皰疹、糖尿病、慢性關節風濕症及乾癬所造成的神經痛有緩和的效果。根據 Dr. Breneman 的報告 Capsaicin 軟膏適用於治療因長期血液透析所引起的皮膚搔癢症，每天塗抹 0.025% 的 Capsaicin 軟膏 (Zostrix®) 四次，經過六週的塗抹後，有 89% 的透析患者其搔癢感得到緩和或完全消失。至於現有市面上販售之含有 Capsaicin 經皮吸收劑如德國辣

椒膏，常被用來減輕風濕關節炎患者的疼痛，另外如市售常見的擦勞滅(Salomethyl®)30 公克的軟膏中也含有 0.25 毫克的 Capsaicin。因此可以得知 Capsaicin 仍是一種很普及化的抗傷痛劑。

在市售辣椒素處方之劑型方面則以半固體軟膏及貼布為主。在美國於臨床上常以含 0.025 %純辣椒素之乳膏 (cream) 治療血液透析病人引起的皮膚搔癢症，因此其為一種處方用藥。而國內亦有國產藥廠跟研發含有純辣椒素之單方軟膏或貼布，如：中國化學、美時、東洋、汎生、好貼等 GMP 藥廠，其劑量亦有 0.025 %、0.03 %、0.07 % 及 0.075 % 不同之藥物濃度。然而由於在台灣傳統醫藥市場上所謂辣椒素軟膏或貼布，其大部份之有效成份均為辣椒之生藥抽提物而非純粹之結晶物，且多為複方之非處方用藥，造成含純辣椒素之單方軟膏仍舊被定位為一種民間用藥，因此無法提昇其價值及使用率。

於計畫主持人之先前論文中，有關辣椒素及其合成衍生物之經皮吸收研究已發表十二篇於國際性科學期刊上，並已建立一套完整的體外及體內評估系統。在體外評估方法方面主要是以離體動物皮膚為滲透障壁，施藥端充填辣椒素處方，受藥端充填 pH 7.4 緩衝液，經由此裝置計算辣椒素於不同處方之釋出速率。而於體內試驗方面，除以大白兔為實驗動物模式進行藥物血中濃度監測外，並以一系列皮膚科臨床上常使用之非侵入性評估儀器監測辣椒素及其合成衍生物投與於

人體前臂內側後之皮膚藥理及生理反應，所使用之儀器包括：雷射都卜勒血流測量儀 (laser Doppler flowmetry)、表皮水份散失量測量儀 (transepidermal water loss)、色差儀 (colorimetry) 及皮膚影像攝影儀 (image analysis)。並以簡易人體經皮吸收方法測量投藥後處方藥物殘餘量以做為藥物吸收能力的參考。此一系列方法經實驗結果證明可有效評估辣椒素處方之經皮吸收能力及其藥理作用，而辣椒素所引起之辛辣感及皮膚紅腫等副作用亦可經由此體內評估方法加以客觀定量，而不似傳統由醫師主觀判斷較具爭議性。因此今擬以先前建立之評估方法以市售純辣椒素之單方半固體劑型為主進行處方有效性及其副作用之評估，並以辣椒素生藥抽提物為有效成份之複方軟膏為對照組，加以比較此二者之間之於療效及副作用方面之差異。

於本計畫之體內人體試驗方面，除以先前建立之評估方法為大綱外，並擬參考美國藥學會 (AAPS) 及食品藥物管理局 (FDA) 於 1998 年最新發表頒布的皮膚局部投與劑型之生體相等性評估準則以修正先前方法 (Shah et al., 1998)，藉此亦可評量此方法的適用性及對中國人種的適宜性。

### 三、研究目的

(一) 經由計算市售辣椒素霜劑的體外經皮吸收速率及藥物皮內含

量，而比較不同處方對辣椒素經皮吸收能力之影響。由於本研究室先前之論文曾指出辣椒素於水性凝膠劑中的釋出速率極高 (Fang et al., 1995)，因此另外擬以自製一系列含不同高分子聚合物之水性凝膠處方進行體外穿透試驗，並與市售處方比較，且歸納處方對辣椒素釋出之主要影響原因或關鍵為何。

(二) 經由人體體內一系列之皮膚臨床評估方法，檢視辣椒素市售產品對人體皮膚所造成之紅腫或血管擴張作用。並藉此得知何處方所引起的辛辣感最低，而可得到最高之病人依順性。同時並與含生藥抽取物之辣椒素軟膏作比較，而得知二種不同來源辣椒素製劑之間的品質及其優劣。除此之外，並可計算此一系列檢驗儀器之定量結果與處方中藥物成分經皮吸收能力是否有一致性，以檢視這些儀器於評估經皮投與處方所扮演的角色。

(三) 修正先前本研究室所使用之人體體內簡易經皮吸收方法 (surface recovery technique) (Chambin-Remoussenard et al., 1993)，而以 1998 年美國藥學會及食品藥物管理局所發表之最新皮膚投與製劑生體相等性評估方法及其準則為藍本；此方法最主要是以特定膠帶剝離角質層的方法檢測藥物皮內含量，而作為評估生體相等性之主要標準，並輔以皮膚生理反應及藥理反應之監測。於本計畫中，可藉由此模擬方法得知，國產辣椒素

軟膏是否與原廠處方有生體相等性。除此之外，擬經由此計畫評量此新方法之可靠性，及其是否可做為將來國產局部投與製劑申請查驗登記時所必須通過之試驗或標準，以解決長久以來局部投與處方於上市前其臨床評估試驗不足之盲點。

## 材料與方法

### 一、材料

#### 一) 試劑與醫材、藥品

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Merck. U.S.A.

Citric acid, Merck. U.S.A.

Acetonitrile, BDH. England

Acetic acid, NIHON SHIYAKU. Japan

Methanol, BDH. England

Lactic acid, WAKO. Japan

Transpore™, 3M. U.S.A.

Micropore™, 3M. U.S.A.

不織布手術巾, Johnson. U.S.A.

小棉球. Taiwan

Parafilm. American National CAN. U.S.A.

### 1-1 Capsaicin 市售產品

Zostrix® 0.025%, GenDerm cream lot No. MDAK. U.S.A.

Zostrix® 0.075% cream , GenDerm lot No. MCNB. U.S.A.

Longs capsaicin® 0.075% cream, Longs drug stores (Canada) lot No. 12901.

Zoscum® 0.025% cream, 中化 lot No. 7CS112. Taiwan

Benejoint® 0.025%, Lane Labs (Australia) lot No. 8H861. U.S.A.

Capzasin P® 0.025%, Thompson medical co. lot No. SCA0698A. U.S.A.

Capsaicin® 0.075% 泛生 lot No. 802934. Taiwan

### 1-2 自製產品需用藥品

Capsaicin , WAKO. Japan

NVA, TCI. Japan

CMCNa, WAKO. Japan

CMCNH<sub>2</sub>, WAKO. Japan

EtOH, FLUKA. Japan

Azone.

Propylene glycol, NIHON SHIYAKU. Japan

Pluronic F127, Sigma. U.S.A.

Chitosan 100, WAKO. Japan



## (二) 溶媒配製

### 2-1 自製處方 pH4 溶媒

每 200ml 中含 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.7ml, 0.1M Citric acid 14ml

### 2-2 體外釋出實驗與 HPLC 分析檢品稀釋 pH7.4 溶媒

每 200ml 中含 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 18.2ml, 0.1M Citric acid 3.1ml

## (三) 自製處方

- (a) Capsaicin 0.025%於各種不同鹽類及不同含量之凝膠劑，即 CMCNa 3%, CMCNa 6%, CMCNa 10%, CMCNH<sub>2</sub> 6%
- (b) Capsaicin 0.025%於凝膠劑 CMCNa 6%中混合助溶劑：EtOH, Propylene glycol.促進劑 Azone, 即 CMCNa6% + EtOH20%, CMCNa 6% + EtOH 20% + Azone 5%, CMCNa 6% + PG 20%
- (c) Capsaicin 0.025%, Capsaicin 0.075%, NVA 0.025%, NVA 0.075%於凝膠劑 CMCNa 6%
- (d) Capsaicin 0.025%於凝膠劑 Pluronic 20%, 25%, 30%以及 Chitosan 2%, 4%, 6%，並以穿透能力較佳的處方中，再設計合併凝膠劑 CMCNa 1% + Chitosan 4%, CMCNa 6% + Chitosan 1%

詳細處方內容列於表一

表一、自製水性凝膠處方內容

Composition	capsaicin	nonivamide	Pluronic	chitosan	CMC-NH <sub>2</sub>	CMC-Na	ethanol	PG	lactic acid	pH4 buffer
F1	0.025	—	20	—	—	—	—	—	—	add to 100
F2	0.025	—	25	—	—	—	—	—	—	add to 100
F3	0.025	—	30	—	—	—	—	—	—	add to 100
F4	0.025	—	—	2	—	—	—	—	5	add to 100
F5	0.025	—	—	4	—	—	—	—	5	add to 100
F6	0.025	—	—	6	—	—	—	—	5	add to 100
F7	0.025	—	—	—	6	—	—	—	—	add to 100
F8	0.025	—	—	—	—	3	—	—	—	add to 100
F9	0.025	—	—	—	—	6	—	—	—	add to 100
F10	0.025	—	—	—	—	10	—	—	—	add to 100
F11	0.025	—	—	1	—	6	—	—	—	add to 100
F12	0.025	—	—	4	—	1	—	—	5	add to 100
F13	0.025	—	—	—	—	6	—	20	—	add to 100
F14	0.025	—	—	—	—	6	20	—	—	add to 100
F15	0.075	—	—	—	—	6	—	—	—	add to 100
F16	—	0.025	—	—	—	6	—	—	—	add to 100
F17	—	0.075	—	—	—	6	—	—	—	add to 100

## (四) 處方配製

### 4-1 配製原則

凝膠劑除 Chitosan 外，其溶媒均為 pH4 之磷酸鹽 Citric acid 緩衝液。

加助溶劑 (EtOH, PG) 者，溶媒含量需扣除助溶劑之容量，再含促進劑 Azone 之重量也需扣除，剩餘容量才是溶媒所需加入之量。

Chitosan 與 CMCNa 1% + Chitosan 4%，溶媒為 5% Lactic acid

### 4-2 配製方法 每次配製 40g

(a) CMCNa 10%, CMCNa 6%, CMCNa 3%, CMCNH<sub>2</sub>, CMCNa 6%+EtOH, CMCNa 6%+EtOH+Azone, CMCNa 6%+PG,

先將凝膠劑倒入燒杯，加入溶媒半量行水合作用（靜置 24 小時），

第二天加入 Capsaicin 後，再加入剩餘半量溶媒，靜置 24 小時。

(b) Pluronic F127 20%, 25%, 30%

先將凝膠劑倒入燒杯，加入溶媒全量，攪拌 1 小時後放置 5°C 冷藏，

第二天再加入 Capsaicin

(c) Chitosan100 2%, 4%, 6%, CMCNa1%+Chitosan100 4%,  
CMCNa6%+Chitosan100 1%

先將凝膠劑倒入燒杯，加入溶媒半量，1 小時後攪拌，靜置 24 小

時行水合作用，第二天加入 Capsaicin 後，再加入剩餘半量溶媒，

用攪拌機攪拌，靜置 24 小時。

## (五)儀器設備

微量天平 TR 64 Denver Instrument company, U.S.A.

微量天平 TR 64 Denver Instrument company, U.S.A.

多磁點攪拌器 VaARI MAG, U.S.A.

電動天平 Mettler Toledo MonoBloc PB 602-s, U.S.A.

離心機, Denver instrument, U.S.A.

離心機, Digisystem Laboratory Instrument, U.S.A.

粘度計 Brookfield, Model DV-2, U.S.A.

試管震盪混合器 Scientific industries, U.S.A.

超音波震盪器 Power Sonic 410, Korea

酸鹼度測定器 Suntex, Taiwan

色差儀 Maxameter MX16, German

試管含橡皮蓋, Taiwan

水浴震盪器 Chering Huei, Taiwan

HPLC Hitachi Japan

Column: Merck 50943 RP-18 層析管, 長 15cm 管內直徑 3.9mm

## 二、方法

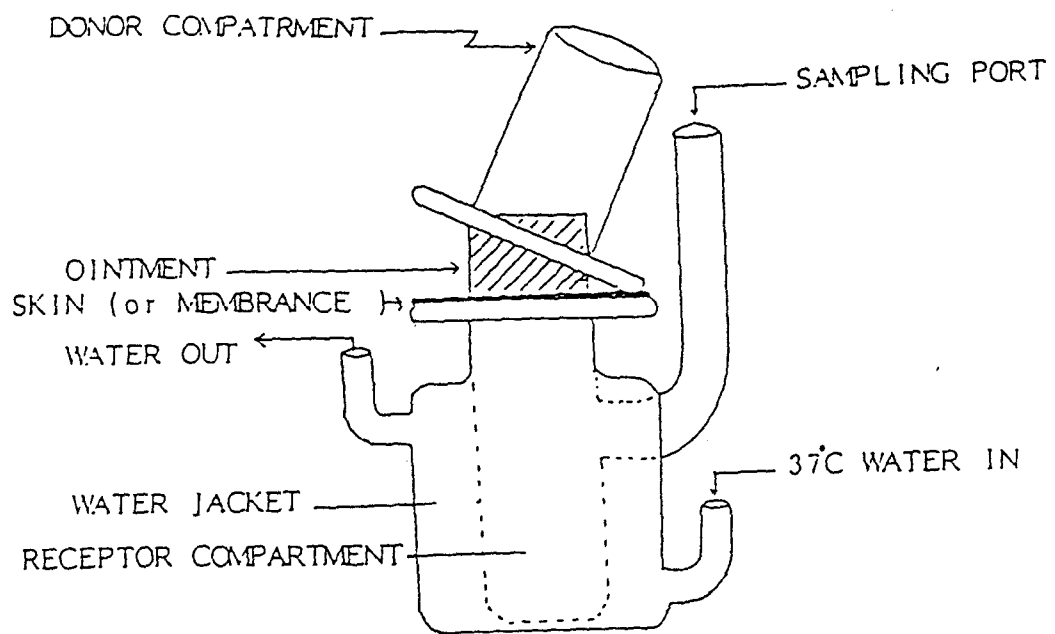
### (一) 軟膏性質測定

#### 1-1. 軟膏粘稠度之測定

使用 Brookfield viscometer RVT DV II CP type 粘度計, spindle 51。稱取各種軟膏處方 0.3gm 置於粘度計之圓盤中, 在 0.5rpm 的轉速下, 60 秒後, 測定 37°C 之粘度值。粘度單位定義為 cps。

### (二) 體外釋出實驗

本實驗採用的軟膏釋出裝置參考自 Yie W. Chien 設計之體外釋出實驗裝置。(圖四)(Chien et al., 1983) 其構造為一組直立式, 上下可分離的雙層擴散玻璃容器。下端容器內充填 10ml 之 pH=7.4 磷酸鹽 citric acid (McIlvaine) 緩衝溶液(含 EtOH 50%), 底部並且放置攪拌石於多磁點攪拌器上以 600 rpm 之定速加以攪拌。(由於有 stagnant layer 形同在供藥端底層有類似角質層屏障, 因此用攪拌石攪拌打破此屏障, 改善軟膏滲透)。在釋出裝置中的內外壁夾層以 37± 1°C 之循環水充填之, 以維持恆定的溫度。上端之容器內則放置一充滿軟膏樣品 1.01gm 的圓柱型中空玻璃管, 其高度為 1.00 cm, 內徑為 1.10 cm。上端的開口則以保鮮膜加以覆蓋。上下二容器間夾著所需之人工膜 (molecular porous membrane "SpectralPor® 2" MW cut-off, 12,000 - 14,000) 或裸鼠 (nude mouse, Balb /c-nu) 腹部皮膚作為滲透障壁, 並且利



圖四 體外穿透試驗直式裝置

用金屬固定夾加以固定，即完成釋出裝置。當放入第一片軟膏開始計時，並於 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h 分別抽取藥液 0.3ml，再注入 0.3ml medium 以維持直立式雙層擴散玻璃容器容量固定，及分析受藥端藥品累積透過量。

### (三) 體內實驗-角質層藥物含量測定

#### 3-1 體內實驗步驟 (包括角質層藥物含量測定檢品收集、皮膚紅斑記錄、自覺症狀記錄)

健康成年男性，20-23 歲，無任何皮膚症，六位;平均身高 173cm (162 – 180cm)，平均體重 63Kg (52 – 70Kg)。受試前先以色差儀測定左、右前臂內側皮膚紅斑基礎值。左右手各四個部位貼上塗於不織布之 0.2gm Zostrix® 0.025%，Zostrix® 0.075%，Zoscum® 0.025%，Capsaicin® 0.075%軟膏，且每一受試部位以 Micropore™ 固定。

貼後 55 分，以 Zostrix® 0.075%的辛辣、刺激感覺為五分，其他產品與其比較，以 0-10 分記錄受試者自覺感受。之後每半時每半小時記錄自覺感受，至受試六小時後或無自覺感受時。

貼後一小時，撕下右手四塊含軟膏之不織布，並丟入試管內，此外以 Methanol 棉球擦拭受試部位，以清除在皮膚上的軟膏，也丟入同

一試管，並用 Parafilm 封住瓶口。同時以色差儀測皮膚紅斑，之後每半時測皮膚紅斑，至受試六小時後或皮膚紅斑值近似基礎值時。

撕下右手含軟膏之不織布的四個部位，各以適度壓力將 Transpore™ 貼上，以撕、貼的動作共進行九次且丟入同一試管，並用 Parafilm 封住瓶口。如此即可撕下角質層，以便進行角質層藥物含量分析。

貼後四小時，撕下左手四塊含軟膏之不織布，重覆前述步驟，記錄自覺感受、皮膚紅斑值，角質層藥物含量分析。

經一星期的吸收藥物清除期間，再試驗含凝膠劑 CMCNa 6%之 Capsaicin 0.025%, Capsaicin 0.075%, NVA 0.025%, NVA 0.075% 。

### **3-2 角質層藥物含量檢品前處理**

含不織布與小棉球試管、Transpore™ 試管，先各加 5ml、3ml Methanol，以水浴震盪器震盪一小時，再以 3000rpm 離心五分，取上清液 1ml。經 HPLC 分析角質層內 Capsaicin, NVA 含量。



### 3-3 角質層藥物含量測定 - HPLC 分析

#### (a) 檢量線

以 pH=7.4 磷酸鹽 citric acid 緩衝溶液(含 EtOH 50% )泡製 Capsaicin 與 NVA 0.02mg/mL, 0.04mg/mL, 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.4mg/mL 各 3 支

#### (b) 分析條件

Mobile phase Acetonitrile : 0.06% Acetic acid = 50:50 pH3.5

Flow rate: 1ml/min

Dectector: Hitachi L-4000H UV detector

Excitation  $\lambda$  : 280nm, Emission  $\lambda$  : 310nm

Integrator Waters 740 data module

Autosampling injector Hitachi L-7200 Inject vol. 20 $\mu$ l

### **(四) 體內實驗-皮膚色差測定**

Mexameter MX16 為 Erythema index meter, 它利用 LED (液晶) 光源及 SiO<sub>2</sub> 偵測器, 可測 erythema index =  $\log_{10}$  (紅光/綠光), 於紅光血色素折射很強, 綠光血色素吸收很強。

#### 4-1 測定原理

以吸收原理測定皮膚中 hemoglobin (erythema)含量, 因而可評量藥物對皮膚的刺激反應。Emitter 及 receiver 的位置需確保只測定

diffusion 及 scattered light。經三個波長 (568nm, 660nm, 880nm)，由接受器測定皮膚的折射光。若 emitted light 量固定，可計算皮膚吸收的光量。詳言之，erythema 乃是選擇相當於血洪素波峰的二個波長，測定皮膚的吸收能力，另一個波長是用於校正其它色素，如 bilirubin 的干擾。

#### 4-2 測定方法

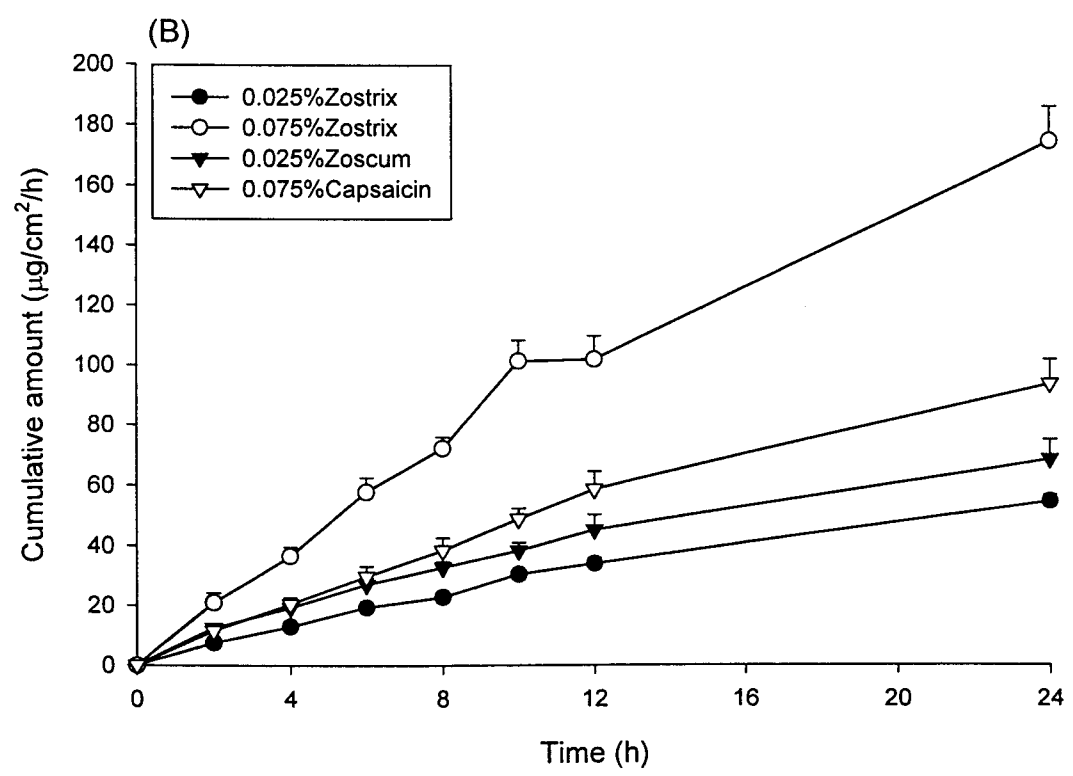
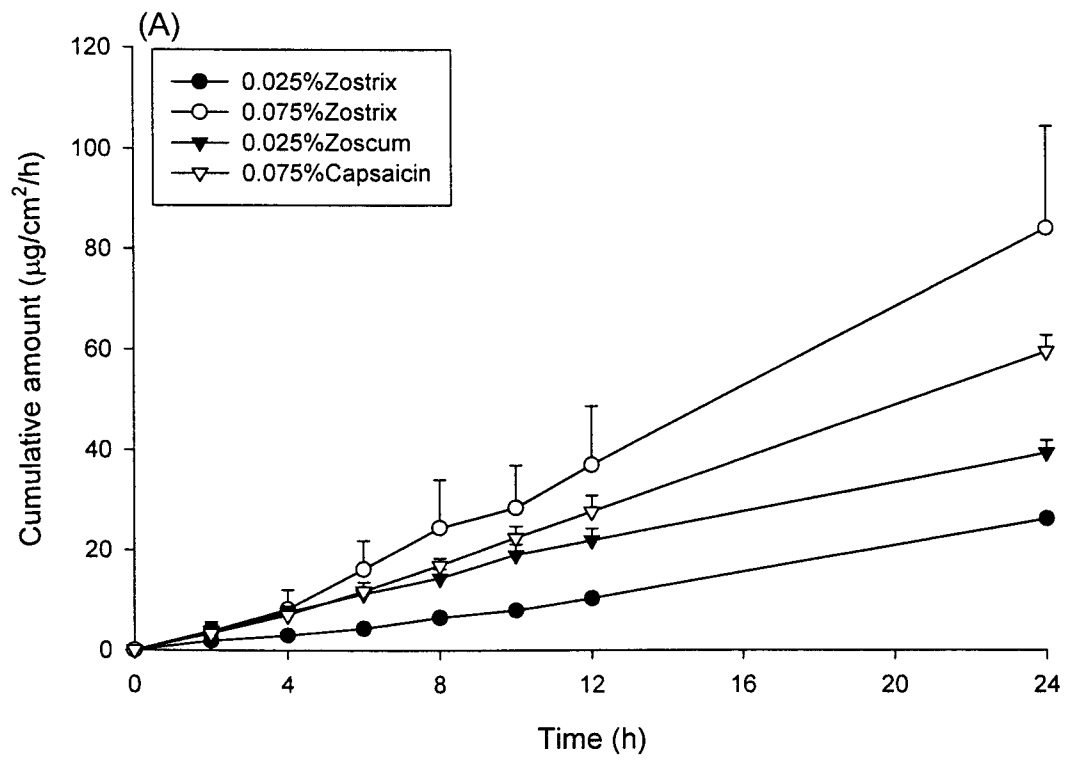
探頭 (probe) 上的彈簧直接以恆定的觸壓前臂內側的施藥部位，即可在數位化畫面上顯示 "E xxx"，同時測定三次取平均值。

### 結果和討論

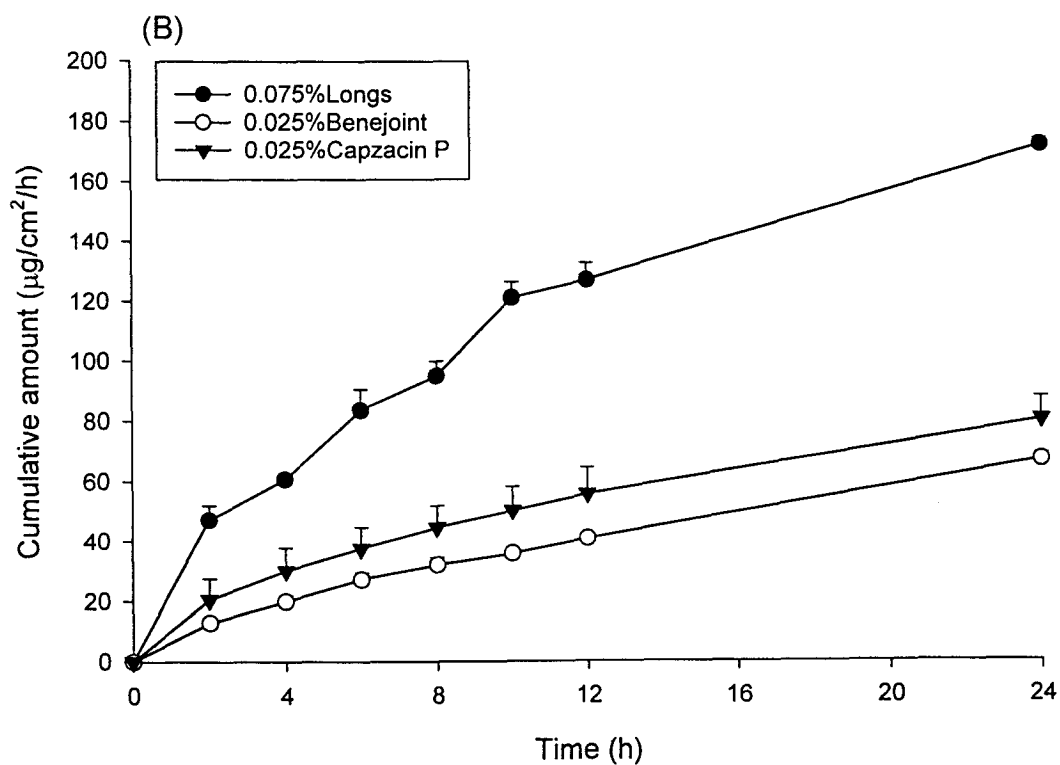
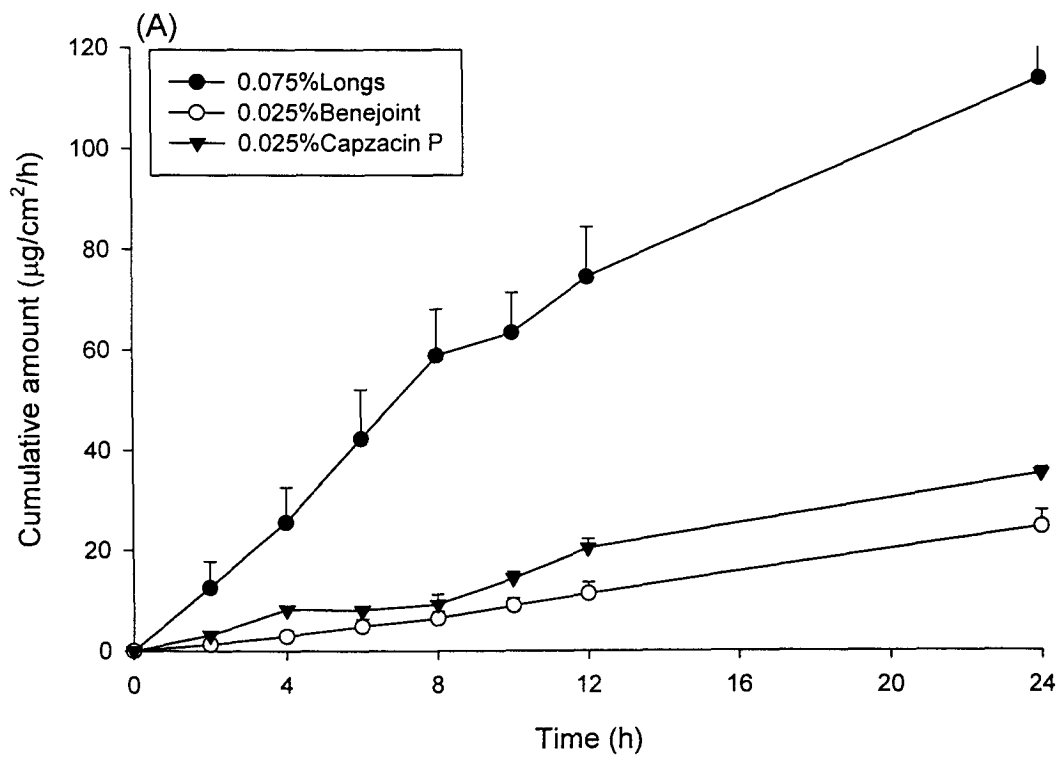
#### (一) 體外評估

##### 1-1 體外評估市售霜劑

含辣椒素之不同市售藥品通過裸鼠皮的累積量-時間圖形，如圖五 (A) 及圖六 (A) 所示，計算所形成線性圖的斜率。由這些斜率計算穿透速率 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  per hour)。這些霜劑的曲線全部均符合零級反應式 (Zero order equation)。含 0.075% 辣椒素的 Zostrix<sup>®</sup> 的穿透速率約為 0.025% Capsaicin 的三倍。通過人工膜的釋出速率亦得到相同的結



圖五 Zostrix® 等市售處方之穿透速率(A)及釋出速率(B)



圖六 Benejoint<sup>®</sup>等市售處方之穿透速率(A)及釋出速率(B)

果，如圖五（B）及圖六（B）所示。

辣椒素自霜劑製劑的穿透速率和釋出速率依序增大：0.025% Zostrix<sup>®</sup> < 0.025% Zoscum<sup>®</sup> < 0.075% Capasaikum<sup>®</sup> < 0.075% Zostrix<sup>®</sup> (表二)。藥物在人工膜的穿透，是經由膜內的膜孔結構。在考慮人工膜的構造，此膜的分子量約為 12,000 – 14,000，即意指藥物分子可經此通道自由擴散，因此藥物的穿透可能單純地與藥物在施藥端溶媒中釋出有關(H.O. HO et al., 1994)。如表二所示，自霜劑基劑釋出藥物，在人工膜的穿透與裸鼠皮的釋出之間，可觀察到一線性關係（相關係數 correlation coefficient,  $r = 0.96$ ）。由此結果可推測霜劑中的辣椒素擴散至皮膚，是控制整個皮膚滲透過程的主要機轉。

## 1-2 體外評估 Pluronic 水性凝膠

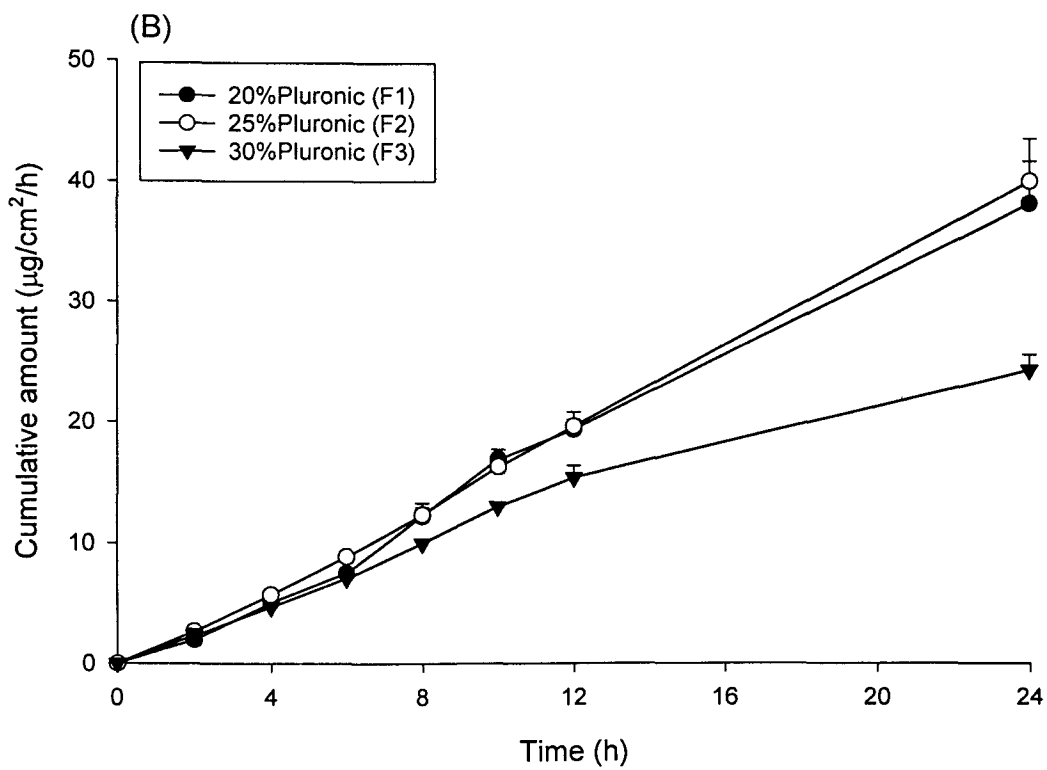
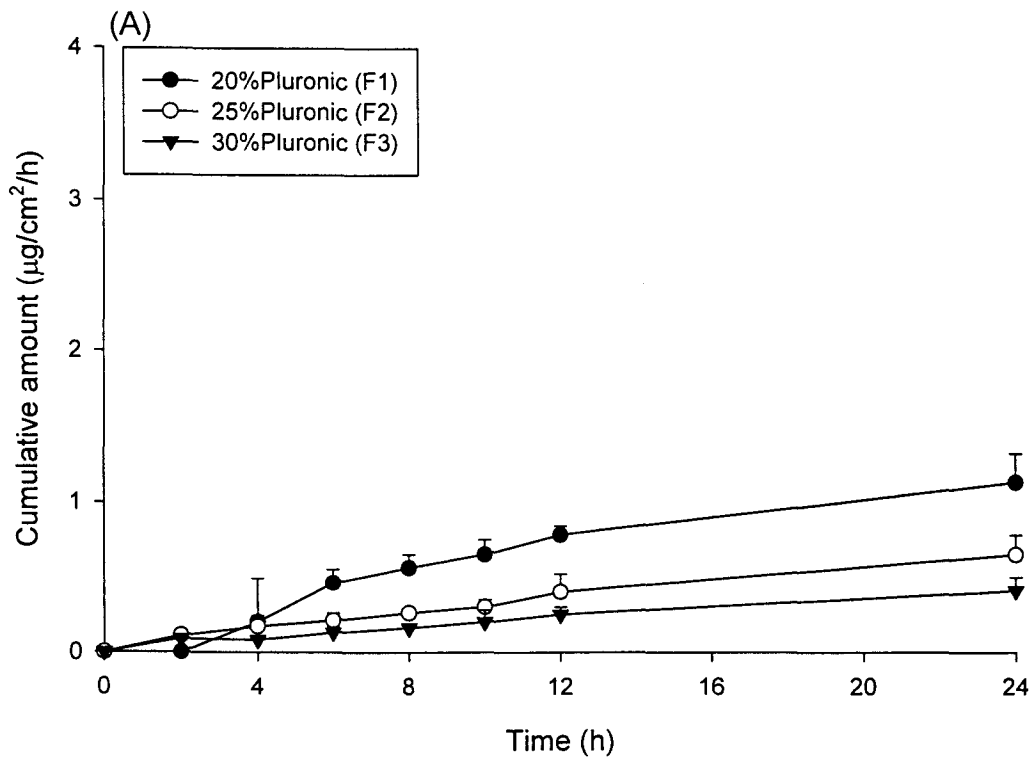
使用一些策略改善目前霜劑，來增加藥物滲透力及患者的遵醫囑性。這些方法之一為利用聚合物製成的水性凝膠，因為這些聚合物有釋出控制特性、良好的組織相容性及易於調節其膨脹程度，因此藥物滲透力將會有些改善（S. W.Kim et al., 1992）。

Pluronic 是被用在藥物傳輸系統的聚合物之一。此聚合物的獨特性是具有可逆性的感溫膠質。20-30% W/W 聚合物的濃溶液在冰箱貯存下是流體（5°C），而在體溫下則是形成軟凝膠（J. M. Barichello et al.,

1999)。Capsaicin 自 20%, 25%, 30% pluronic 水性凝膠中穿透速率及釋出速率 (圖七) 呈現零級反應。一般而言, 穿透速率及釋出速率會隨著 pluronic 在製劑中濃度的增加而減少, 如表二所示。Pluronic 水性凝膠為微膠粒組成黏稠、等方性(isotropic)之液狀結晶, 這假說是藥物經由水性凝膠基質的微膠粒(micelle)外之水性通道(water channel)擴散而釋出, 而且 pluronic 的濃度愈高, 會使水性通道的尺寸與微膠粒的生長變小, 或是增大其扭曲 (tortuosity) (J. M. Barichello et al., 1999. S.C. Shin et al., 1999)。與市售霜劑相比, pluronic 水性凝膠顯示會阻止辣椒素的皮膚穿透。若藥物在製劑中的通透性是速率決定步驟時, 製劑黏度在控制藥物穿透皮膚佔有重要的角色(H.O. HO et al., 1994)。如表二所示, pluronic 水性凝膠的黏度已經超過黏度測定機可測定範圍, 而且遠超過其它霜劑製劑的黏度。這也應證了一個通則: 當製劑的黏度增加, 就使結構更僵直(rigid)、強化, 因而降低了釋出速率。

### 1-3 體外評估聚甲殼糖 (Chitosan) 水性凝膠

聚甲殼糖是衍生自甲殼類外殼的鹼性去乙酰化產品 (J. X. Lu et al., 1999)。此天然陽離子聚糖具有生物可利用的性質, 如無毒性、生體相容性高級無抗原性 (J. X. Lu et al., 1999. C. J. Tsai et al., 1999)。雖然聚甲殼糖水性凝膠將 0.025% capsaicin 傳輸穿透裸鼠皮是零級反應,



圖七 Pluronic 20-30%之穿透速率(A)及釋出速率(B)

表二、所有處方之黏度、穿透速率及釋出速率

Formulation	Viscosity (cps×10 <sup>3</sup> )	Flux (μg/cm <sup>2</sup> /h or μg/cm <sup>2</sup> /h <sup>1/2</sup> )	Release rate (μg/cm <sup>2</sup> /h or μg/cm <sup>2</sup> /h <sup>1/2</sup> )
0.025%Zostrix®	7.92±0.56	1.09±0.14	2.25±0.09
0.075%Zostrix®	8.92±1.90	3.56±0.87	7.26±0.46
0.025%Zoscum®	21.33±0.90	1.64±0.11	2.75±0.29
0.075%Capsaicin-C®	11.27±0.90	2.52±0.14	3.91±0.32
0.075%Longs®	3.68±0.10	4.77±0.50	36.28±0.49*
0.025%Benejoint®	57.67±4.24	1.04±0.13	2.63±0.11
0.025%Capzacin P®	8.95±0.87	1.47±0.03	16.55±1.14
F1	> 102.00	0.06±0.01	1.64±0.23
F2	> 102.00	0.03±0.01	1.69±0.07
F3	> 102.00	0.02±0.01	1.04±0.06
F4	1.50±0.06	4.90±0.65	32.89±3.92*
F5	24.40±0.40	2.89±0.24	22.50±3.93*
F6	69.13±1.80	2.53±0.36	16.68±2.34*
F7	> 102.00	3.88±0.10	27.96±1.65*
F8	1.13±0.11	6.79±0.72	39.78±4.21*
F9	40.67±0.31	4.69±0.20	21.28±2.11*
F10	> 102.00	2.17±0.33	23.87±5.63*
F11	53.20±0.53	3.37±0.49	25.93±2.83*
F12	28.20±13.46	2.37±0.13	23.65±3.58*
F13	94.60±4.72	3.42±0.44	30.13±5.74*
F14	> 102.00	2.36±0.24	15.2±0.83*
F15	40.67±0.31	4.63±0.59	12.69±0.58
F16	40.67±0.31	14.32±1.47*	12.41±1.10
F17	40.67±0.31	18.14±3.46*	21.12±0.60

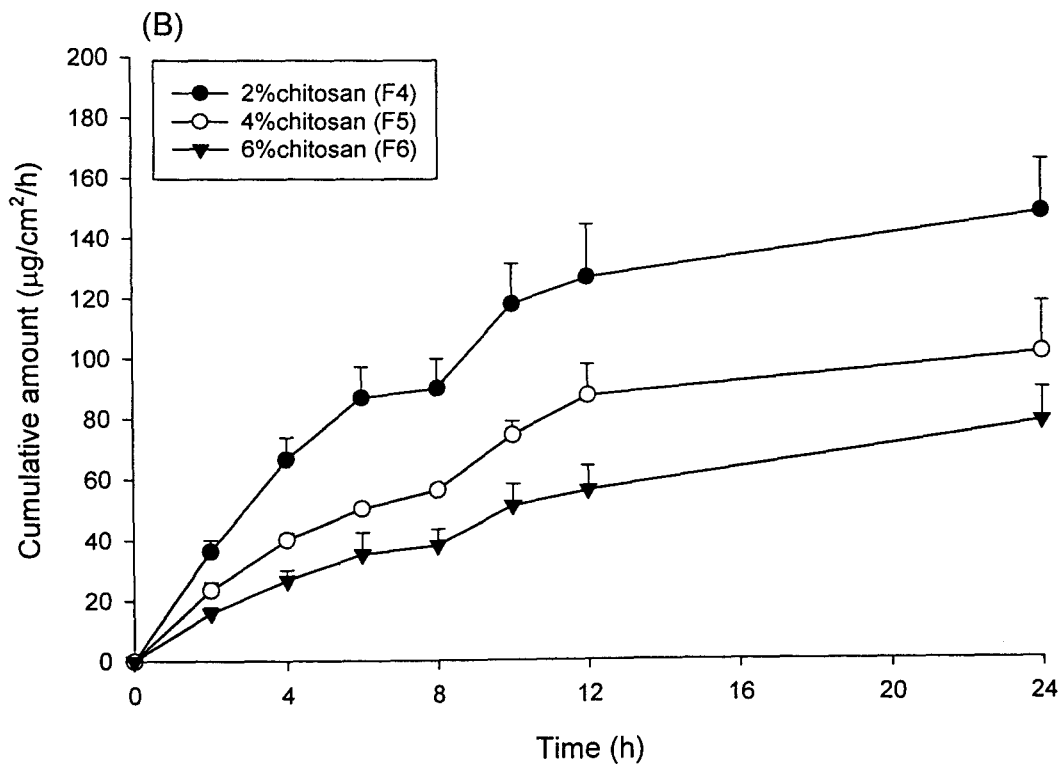
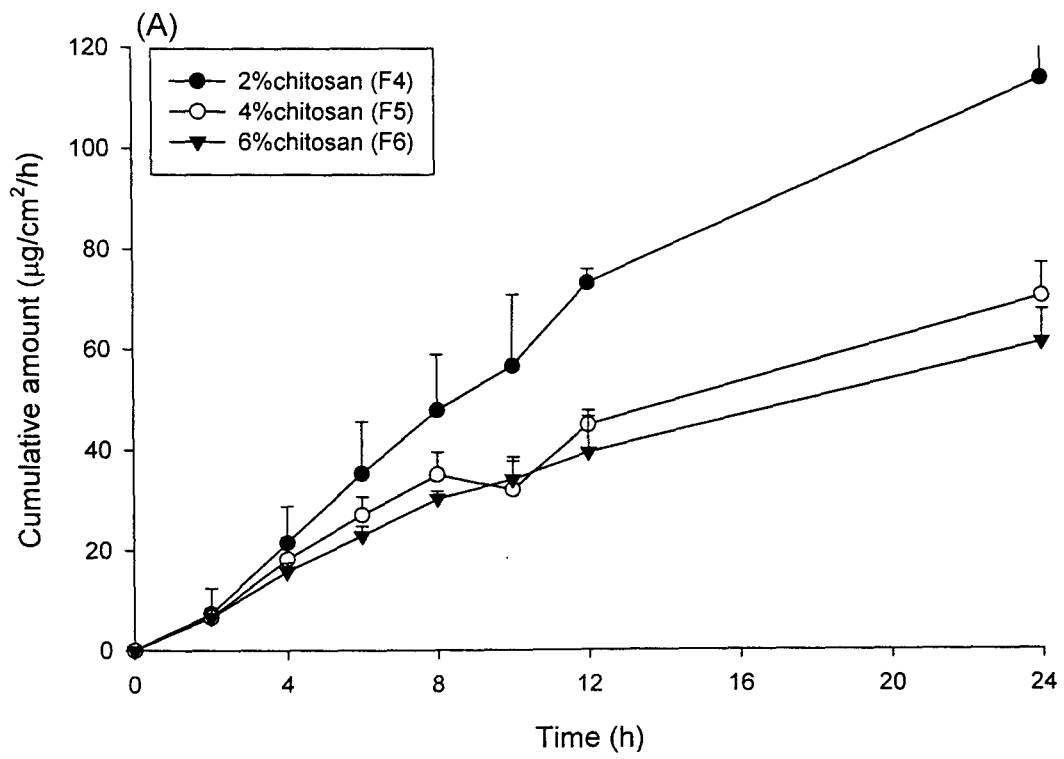
\* Higuchi kinetic model

Each value represents the mean±S.D. (n=4).



但 capsaicin 在人工膜的釋出是依循 Higuchi 動力學，經由計算相關係數 ( $r = 0.98 - 0.99$ ) 後發現優於零級反應 ( $r = 0.89 - 0.96$ )。此即意指辣椒素在聚甲殼糖的局部塗敷後期釋出有延阻現象。聚甲殼糖的濃度由 2% 增至 6% 時，(圖八)，穿透速率及釋出速率顯著降低 (表二)。這是因為當聚甲殼糖的濃度增加，聚合物的糾結程度增大及有效的分子面積縮小。在聚甲殼糖水性凝膠中辣椒素的穿透速率及釋出速率呈線性相關性 ( $r = 0.98$ )，意謂著 capsaicin 在凝膠基質擴散具有重要意義。

所有聚甲殼糖水性凝膠製劑中，辣椒素穿透速率皆顯著高於市售 0.025% 辣椒素霜劑 (t-試驗， $p < 0.05$ )。聚甲殼糖水性凝膠 4% 及 6% 的黏度顯著高於其它霜劑製劑 (t-試驗， $p < 0.05$ ) (表二)。此現象顯然與之前的結果與討論相互矛盾，因為當藥物的滲透是速率決定步驟時 (H. O. Ho et al., 1994)，黏度與藥物的穿透基本上是成反比關係，因此推測在製劑中除辣椒素的擴散機制外，應該另有其它機制影響辣椒素在聚甲殼糖水性凝膠的辣椒素穿透。以前的研究證實辣椒素藉由製劑與角質層的分配係數，經脂肪通路穿透至皮膚的深層 (J.Y. Fang et al., 1995)。製劑與角質層之間的分配係數差異，將決定藥物進入角質層之穿透量。因為聚甲殼糖水性凝膠較 oil in water 霜劑較親水性，所以可預期親脂性辣椒素的分配係數較有利於角質層。此理論也可部分

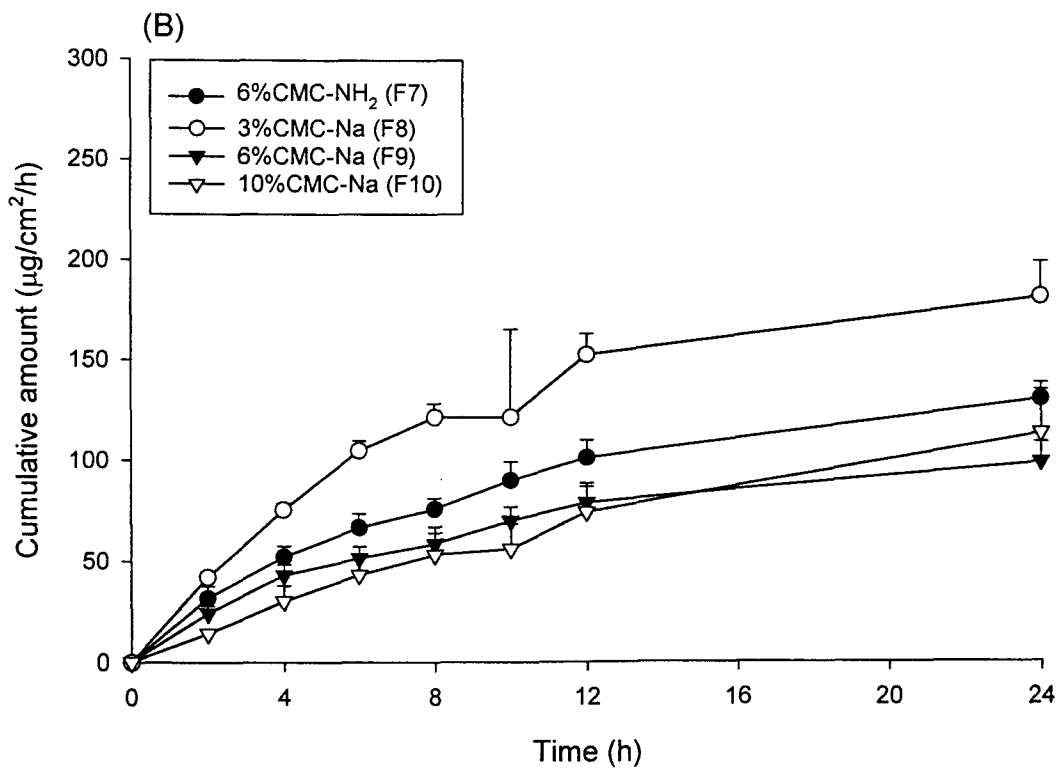
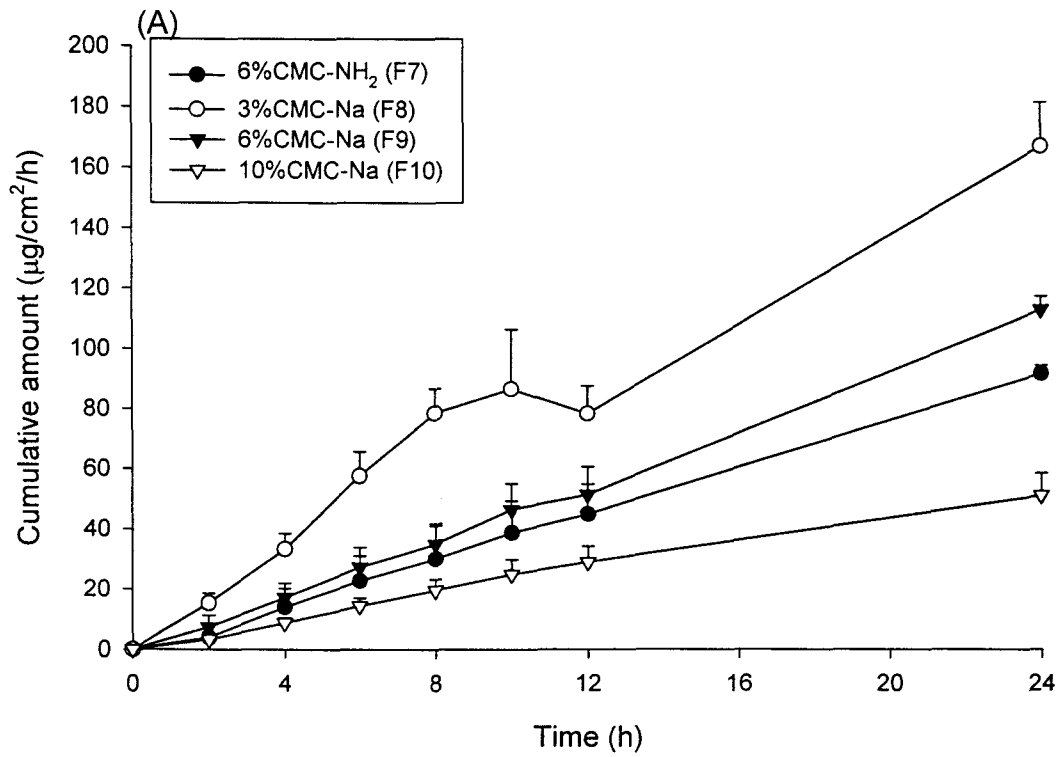


圖八 Chitosan 之穿透速率(A)及釋出速率(B)

解釋，與聚甲殼糖水性凝膠相比，pluronic 水性凝膠的滲透較差，基本上是因為加入 pluronic 處方中的水量較少，造成辣椒素在 pluronic 中的製劑-角質層分配係數比聚甲殼糖水性凝膠大。

#### 1-4 體外評估 CMC 水性凝膠

陰離子性的 CMC 為一種合成的水溶性纖維素 (water soluble cellulose)，大部分可用為藥物傳輸系統的基質 (E. Doelker et al., 1987)。茲比較辣椒素自 CMC 自不同的對等離子(counterion)，如-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 及-Na<sup>+</sup>的釋出性質，如同聚甲殼糖水性凝膠，辣椒素自 CMC 水性凝膠的釋出速率似乎遵循 Higuchi 動力學 ( $r = 0.98 - 0.99$ )。辣椒素自 CMCNa 經人工膜的釋出速率比 CMCNH<sub>4</sub> 明顯較低 (t-試驗  $p < 0.05$ ) (圖九及表二)，但此二者經由裸鼠皮的穿透速率卻呈現相反的結果，這可能是因為 CMCNa 對裸鼠皮的生體附著性較好。附著特性會增加塗敷部位的停留時間，因而改善通透係數 (E. Doelker et al., 1987. D. S. Jones et al., 1997)。CMCNa 水性凝膠的黏度，會隨著聚合物含量的增加而增加 (表二)。製劑黏度的增加會延緩辣椒素的通透，此乃基於黏度較高時，藥物要由附著的基質通透裸鼠皮較困難 (C. K. Lee et al., 1995)。辣椒素自 CMCNa 水性凝膠的穿透速率一般較其它霜劑和水性凝膠為高，此即可證明 CMCNa 更具親水性質 (E. Doelker et al., 1987.

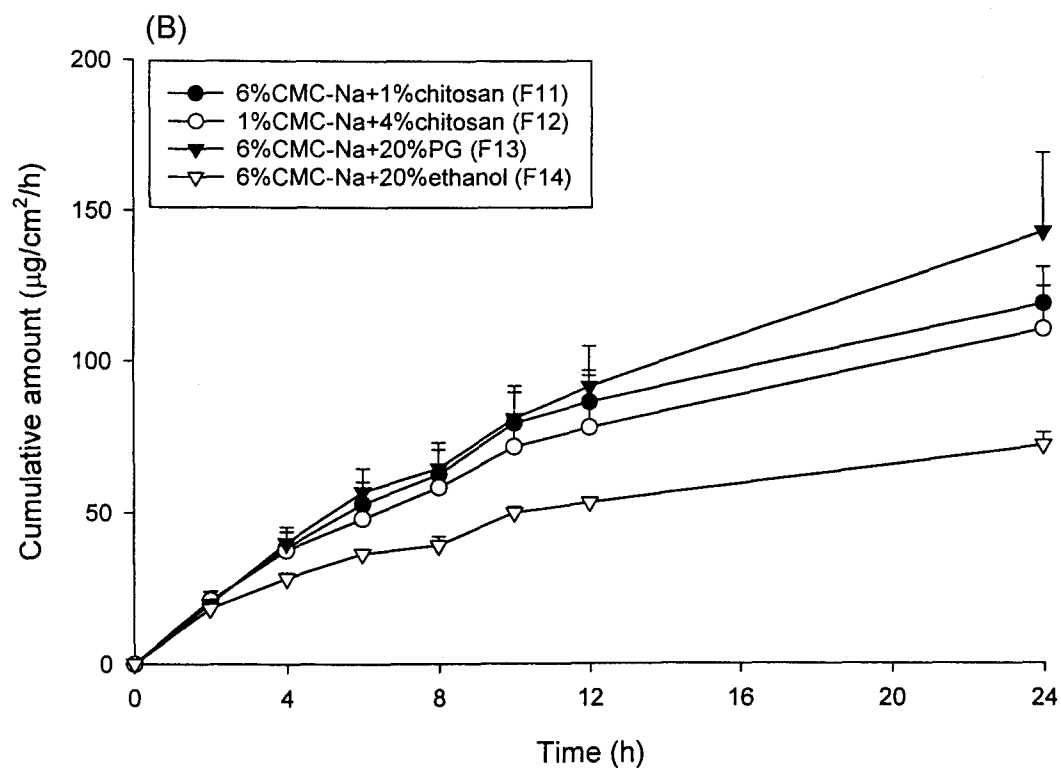
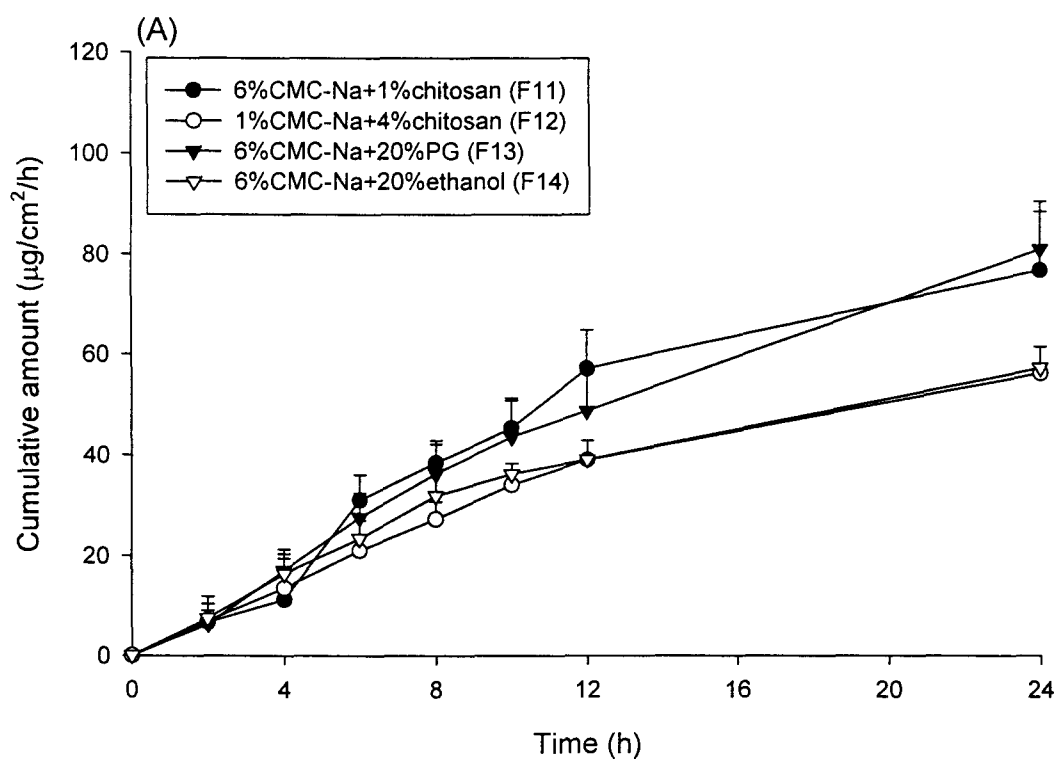


圖九 CMCNa, CMCNH<sub>4</sub> 之穿透速率(A)及釋出速率(B)

B. Narasimhau et al., 1997)，使得辣椒素易由 CMCNa 凝膠基質分配至裸鼠皮。

為了克服合成的聚合物缺乏生物相容性(biocompatibility)，以及提高天然聚合物的機械性 (mechanical properties)，CMCNa 以不同比例與聚甲殼糖水性凝膠混合 (圖十)，聚甲殼糖水性凝膠加入 CMCNa 水性凝膠中，可減少辣椒素的穿透速率 (表二)。CMCNa 水性凝膠加入聚甲殼糖水性凝膠中，也可看到相似的現象 (表二)。這可能是由於聚甲殼糖水性凝膠與 CMCNa 水性凝膠會產生交互反應，形成不溶於水的複合體(complex)及緻密的結構，這兩種聚合物在凝膠基質中，比單一聚合物的二相水性凝膠之黏度較高(S. Y. Liu et al., 1992)。

助溶劑包括 propylene glycol 與乙醇也合併入 CMCNa 水性凝膠中 (圖十)。如表二所示，propylene glycol 與乙醇皆會減少辣椒素經由裸鼠皮的通透能力，此結果可能是由於加入助溶劑，即是疏水性有機溶劑，會減少水性凝膠的極性，辣椒素分子進入已加入助溶劑的水性凝膠之藥物-處方親和力，會比親水性的非助溶劑凝膠為強。加入 propylene glycol 的水性凝膠和非助溶劑水性凝膠的釋出速率則無明顯差異 (t-試驗  $p > 0.05$ )，進一步而言，辣椒素在乙醇製劑，其人工膜的釋出速率比裸鼠皮的穿透速率的抑制效應小，這表示了除親和力的因素以外，在水性凝膠和辣椒素之間尚有其它因素支配辣椒素在加入

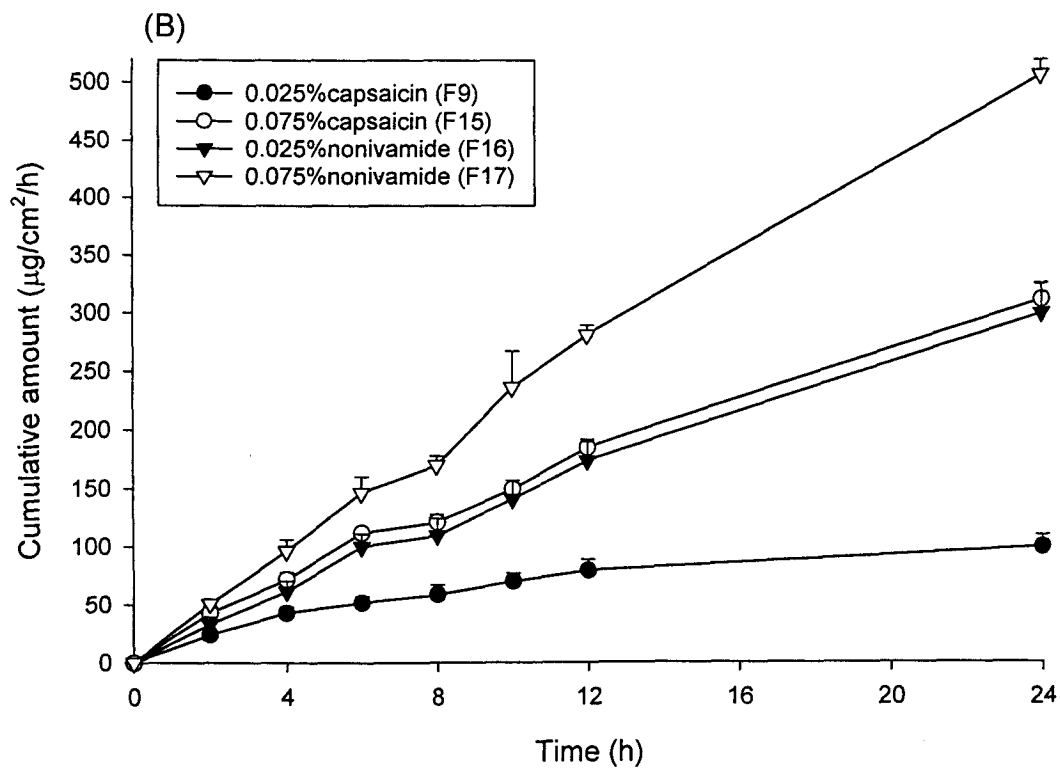
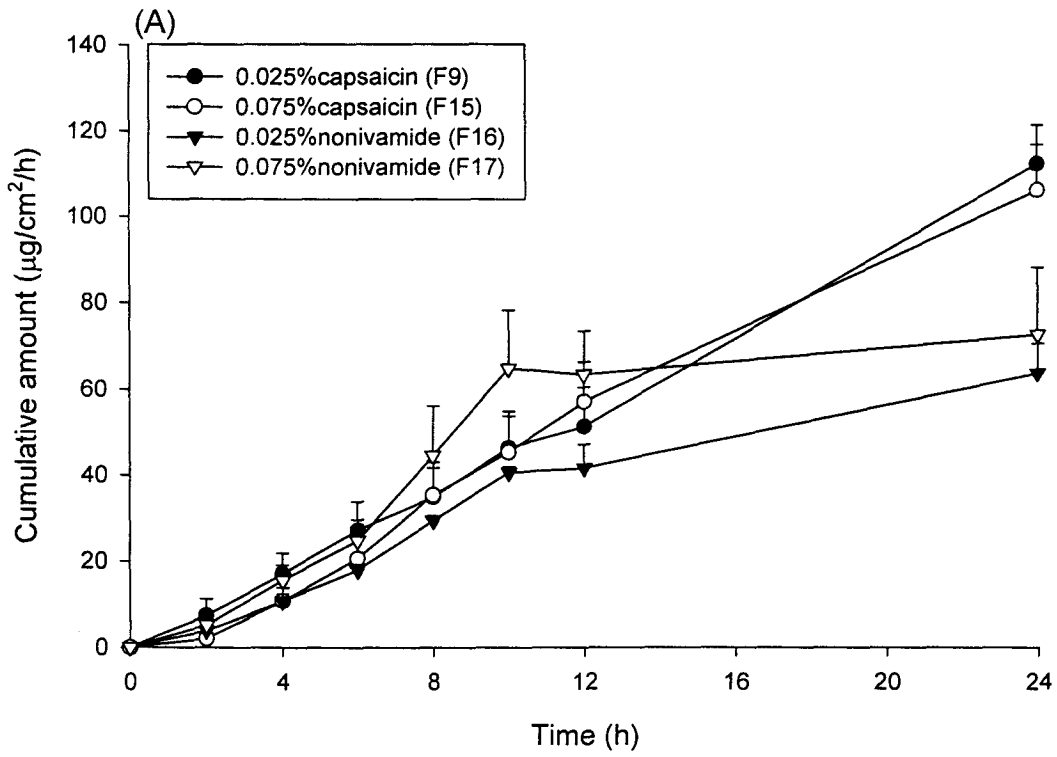


圖十 CMCNa + Chitosan 之穿透速率(A)及釋出速率(B)

助溶劑的水性凝膠中穿透裸鼠皮。先前研究已顯示 propylene glycol 與乙醇有改變皮膚屏障的能力(E. Aspe et al., 1995)，由於 propylene glycol 與乙醇會誘發皮膚結構的改變，因此會減少藥物通透皮膚的程度 (T. inagie et al., 1981. J. Y. Fang et al., 1999)。

高濃度(0.075%)的辣椒素釋出速率明顯比低濃度(0.025%) 為高 (圖十一及表二)，但通過裸鼠皮的穿透速率是差不多。這是由於雖然辣椒素含量較高的產品，經由 CMCNa 水性凝膠的通透速率也會較高，而小量的辣椒素進入皮膚內會達到完全飽和的現象，因此延阻辣椒素進一步進入已飽和的皮膚。由圖五可發現 Zostrix<sup>®</sup>霜劑中就沒有此現象，這是因為辣椒素在此製劑比水合凝膠的擴散低，因此皮膚貯存槽(drug reservoir)於霜劑中釋出從沒達到飽和狀態。

Nonivamide 自 CMCNa 水性凝膠的釋出速率(圖十一)比 0.025%，0.075%辣椒素明顯增高 (t-試驗  $p < 0.05$ )，但是 nonivamide 通透皮膚的能力在體外局部塗敷的取樣後期(10-24h)，則無明顯增加，且在 24 小時的 nonivamide 累積量甚至低於辣椒素製劑 ( t-試驗  $p < 0.05$ )。此可能意謂著較小量的 nonivamide 就會飽和皮膚貯存槽。另一理由為依據 n-辛醇/水分配係數，可知 nonivamide 的親水性比辣椒素大 (Y. H. Tsai et al., 1994)，故造成 nonivamide 分配至皮膚的能力較差，因此也影響了 nonivamide 的穿透皮膚能力。



圖十一 Capsaicin 不同濃度之穿透速率(A)及釋出速率(B)



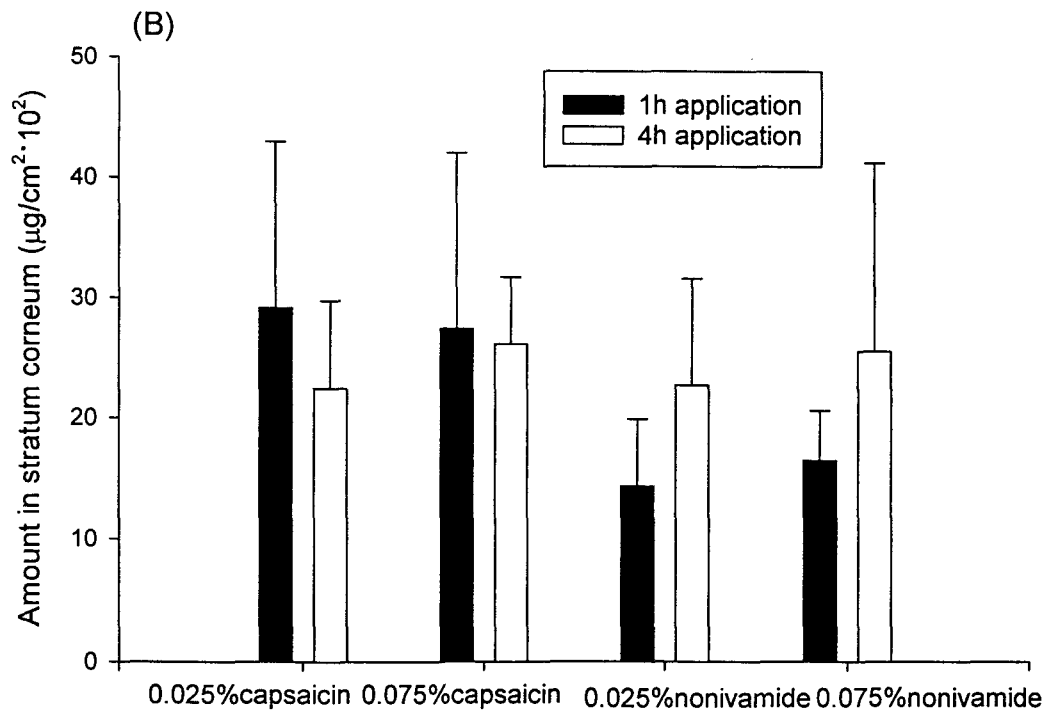
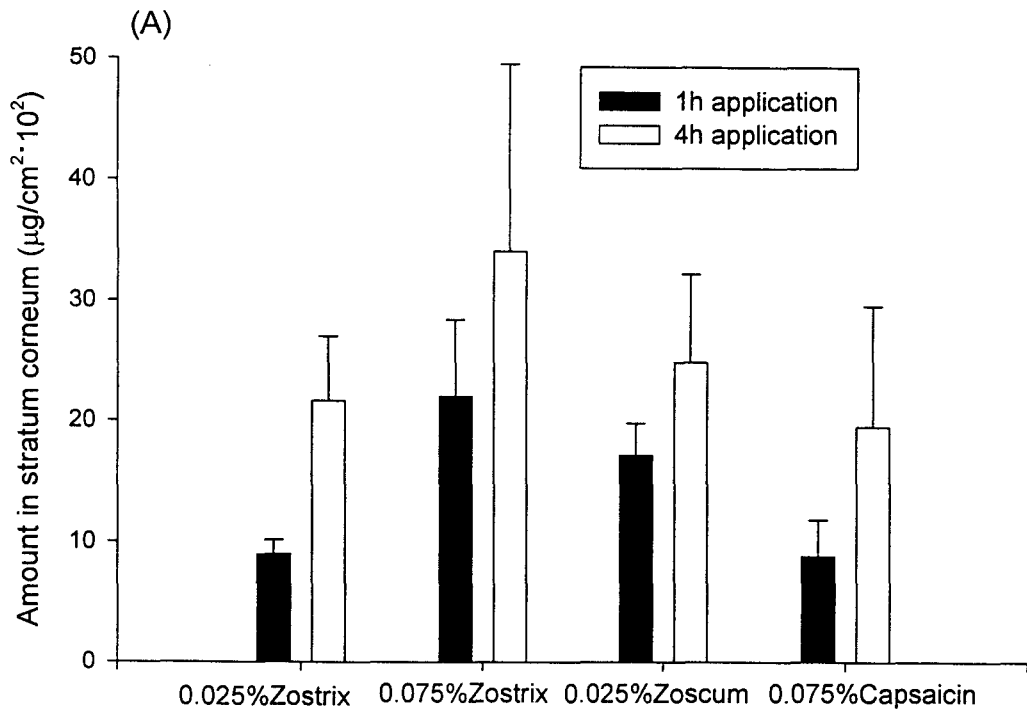
## (二) 體內評估

### 2-1 皮膚剝片(Skin strippings)

選擇市售霜劑及含 0.025%與 0.075%辣椒素和 nonivamide 的 CMCNa 水性凝膠 (圖十二)，作下列體內評估的研究。

在人身上塗敷一小時及四小時後，檢測在角質層中辣椒素及 nonivamide 的累積量。皮膚剝片技術是由 FDA 最近核准的指導方針修正而來(V. P. Shah et al., 1998)，圖十一顯示所有霜劑塗敷四小時後，辣椒素的累積量比一小時後較高，雖然在 0.075% Zostrix<sup>®</sup>及 0.025% Zoscum<sup>®</sup>一小時及四小時累積量間並無意義的差異(t-試驗  $p > 0.05$ )。0.025% Zostrix<sup>®</sup>在四小時的累積量約等於 0.075% Zostrix<sup>®</sup>一小時累積量，此即表示霜劑中較高劑量塗敷的辣椒素之穿透皮膚能力較低劑量為大。除了 Capsaicin 以外，體內皮膚剝片和體外穿透皮膚能力均顯示有相同的趨勢： $0.025\% \text{ Zostrix}^{\text{®}} < \text{Zoscum}^{\text{®}} < 0.075\% \text{ Zostrix}^{\text{®}}$ ，在一小時的相關係數  $r = 0.90$ ，四小時則為  $r = 0.99$ ，藉此可證明在體內狀態，辣椒素自 Capasaium 的穿透皮膚能力較於體外穿透試驗呈現者為差。

含 0.025%辣椒素的 CMCNa 水性凝膠 (圖十二)，在一小時的累積量比 0.025% Zostrix<sup>®</sup>顯著較多 (t-試驗， $p < 0.05$ )。但 CMCNa 水性



圖十二 Skin strippings – Capsaicin 及 nonivamide 於角質層之累積量

凝膠，在一小時及四小時的累積量與 0.025% Zostrix® 四小時的累積量間並未觀察到顯著差異 (ANOVA 試驗,  $p > 0.05$ )。含 0.075% 辣椒素的 CMCNa 水性凝膠，一小時及四小時的累積量亦接近含 0.025% 水性凝膠的值，此結果證實 CMCNa 僅在局部塗敷階段提供辣椒素較高的穿透皮膚能力，此現象無法維持較久，可能因為角質層中的貯存槽 (drug reservoir) 已飽和。於先前之 CMCNa 水性凝膠的體外穿透皮膚試驗，亦已提出相同之解釋。

與體外穿透皮膚試驗結果相同，在角質層中 nonivamide 的一小時累積量低於辣椒素的量，雖然於統計學上並無發現有顯著差異 (t-試驗,  $p > 0.05$ )。CMCNa 水性凝膠的四個產品四小時累積量則皆是相似的状态。

## 2-2 皮膚紅斑測試 (Skin erythema)

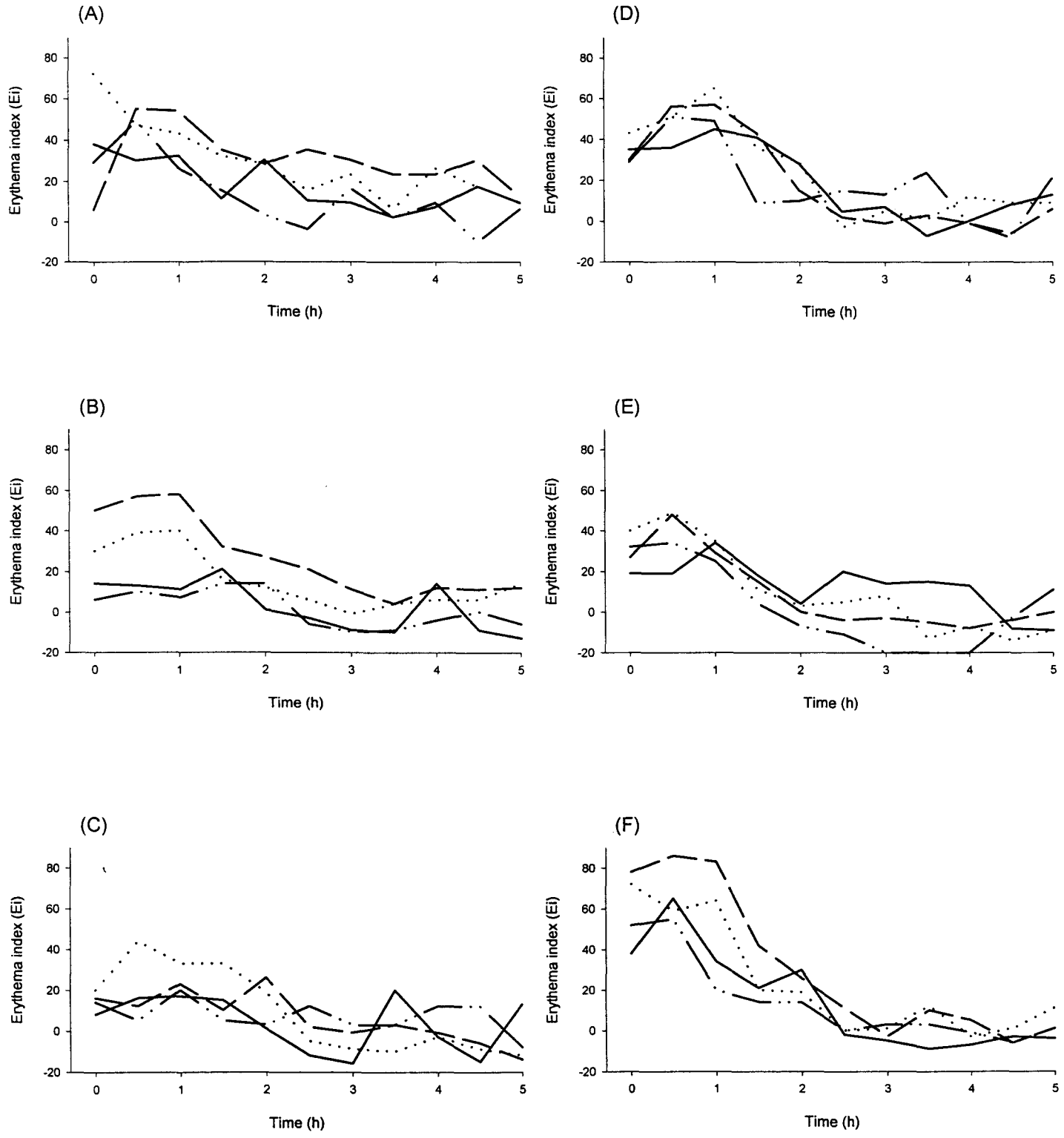
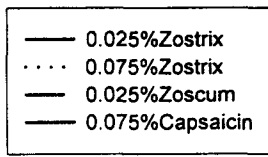
本計畫原擬使用包括 colorimetry, laser doppler flowmetry (LDF) 及 transepidermal water loss (TEWL) 來測定體內辣椒素之反應試驗，由於 LDF 及 TEWL 商借困難，尤其完整之 LDF 系統只在高雄醫學大學有一套，為配合試驗於台北地區進行，因此最後選擇 colorimetry 為皮膚紅斑測試之儀器。

Mexameter MX16 為 Erythema index meter, 它利用 LED (液晶)

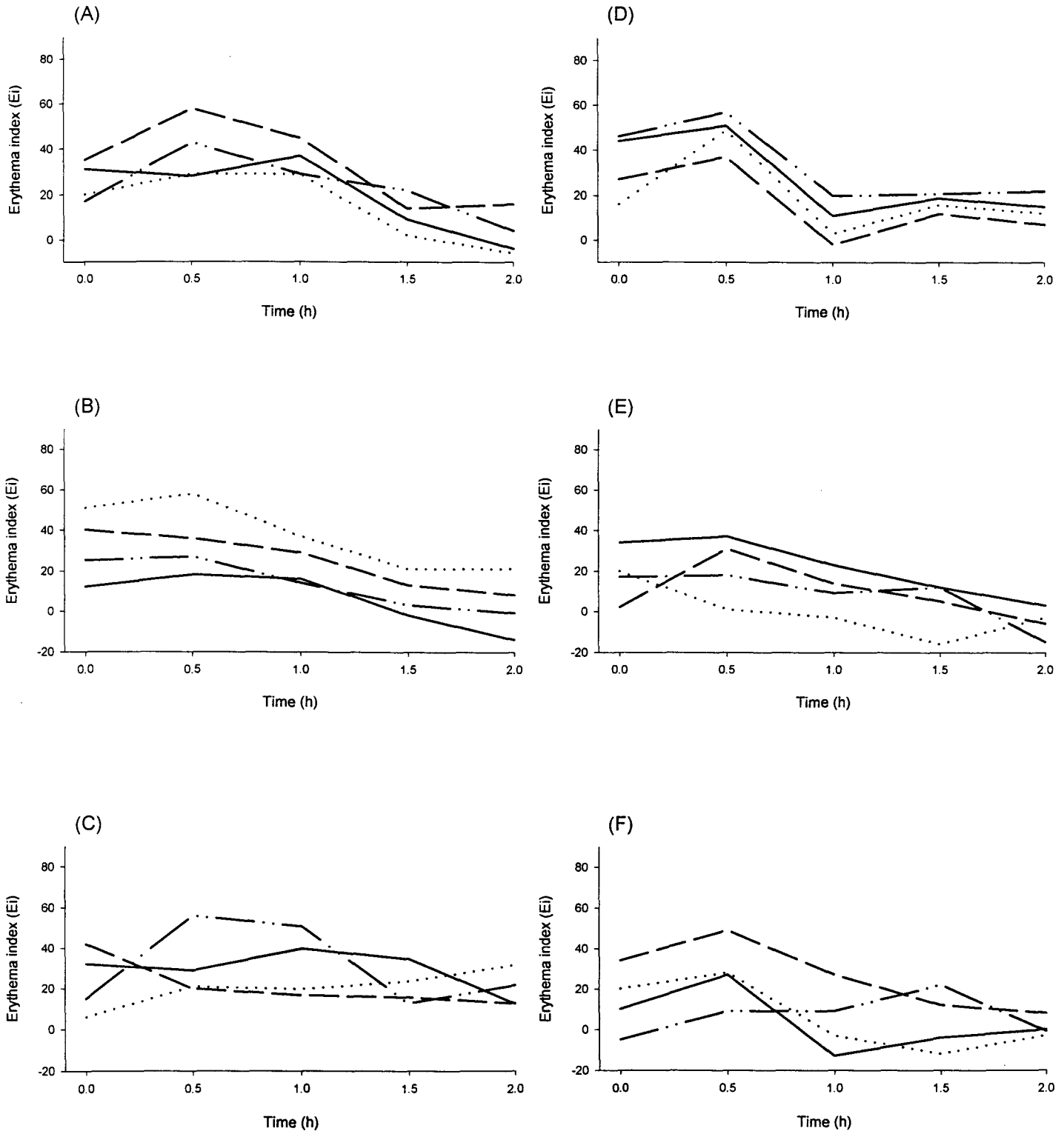
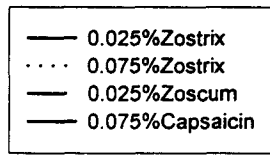
光源及 SiO<sub>2</sub> 偵測器，可測 erythema index = log<sub>10</sub> (紅光/綠光)，於紅光血色素折射很強，綠光血色素吸收很強。

以吸收原理測定皮膚中 hemoglobin (erythema) 含量，因而可評量藥物對皮膚的刺激反應。Emitter 及 receiver 的位置需確保只測定 diffusion 及 scattered light。經三個波長 (568nm, 660nm, 880nm)，由接受器測定皮膚的折射光。若 emitted light 量固定，可計算皮膚吸收的光量。詳言之，erythema 乃是選擇相當於血洪素波峰的二個波長，測定皮膚的吸收能力，另一個波長是用於校正其它色素，如 bilirubin 的干擾。

在局部塗敷辣椒素霜劑一小時及四小時後，出現的皮膚紅斑分別如圖十三及圖十四所示。在安慰組顯示 Ei 值在檢測期間全部皆接近 0。在此紅斑反應試驗中發現個體間出現相當大的差異，這種差異可以由不同個體間，皮膚對刺激劑感受性的真正生物差異來解釋 (T. Agner et al., 1990. R. G. D. Roberts et al., 1992)。所有受試者在局部塗敷霜劑後，一小時內出現最大的紅斑指數 (Ei<sub>max</sub>)，然後在二小時測定後，Ei 值逐漸持平。辣椒素的治療作用來自最初的神經刺激作用，它會引發紅斑及辛辣感。在第一次塗敷期間可看到此協同作用。由於辣椒素會防止神經性蛋白棟的再累積，所以最初的紅斑及疼痛會逐漸減輕 (D. A. Simone et al., 1991)，因此在局部塗敷辣椒素後，皮膚會



圖十三 Skin erythema - Zostrix®等市售處方投與一小時之發紅現象



圖十四 Skin erythema - Zostrix<sup>®</sup>等市售處方投與四小時之發紅現象

出現早期的刺激，進行到後期則有抑制現象，後期抑制現象的另一個解釋為，霜劑基劑去除後，藥物貯存槽則逐漸空盪，皮膚此時也不再吸收累積辣椒素。從受試者本身自覺反應來看，所有受試者的辛辣感測定顯示：在去掉辣椒素霜劑後 0 或 0.5 小時的感覺最大。資料顯示受試者有較早期的辛辣感，之後為皮膚紅斑，在除去霜劑 1.5 小時後，所有受試者皆測定無辛辣感（0 級）（表三）。

在所有受試者 0.075% Zostrix<sup>®</sup>的  $E_{i_{max}}$  值皆比 0.025% Zostrix<sup>®</sup> 高，此即表示皮膚的反應受塗敷劑量而定（圖十三），受試者記錄的辛辣感報告亦有相同的結果。此種結果可能是由於 0.075% Zostrix<sup>®</sup> 的辣椒素穿透皮膚能力較高，如在體外穿透皮膚試驗與體內皮膚剝片試驗中所觀察到的結果一樣。在體外及體內試驗中，Zoscum<sup>®</sup> 中辣椒素的穿透皮膚能力皆較 0.025% Zostrix<sup>®</sup> 高，且所有受試者的  $E_{i_{max}}$  值，Zoscum<sup>®</sup> 大於 0.025% Zostrix<sup>®</sup>。0.075% Capsacine<sup>®</sup> 及 0.025% Zostrix<sup>®</sup> 分別有三分之二及三分之一受試者的  $E_{i_{max}}$  值最低，這意指此兩種霜劑的辣椒素穿透皮膚能力低。在塗敷四小時除去辣椒素霜劑後 1-1.5 小時內，皮膚紅斑回復到正常情況（圖十四）。0.025% 及 0.075% Zostrix<sup>®</sup> 之間， $E_i$  值的比較差異不大。在比較 0.025% Zostrix<sup>®</sup> 及 Zoscum<sup>®</sup> 霜劑，也看到相同現象，因三個受試者在 0.025% Zostrix<sup>®</sup> 顯示有較高的  $E_i$  值，而其它三個受試者則有相反的結果，這意指在長期給藥期間後，辣椒素

表三

## 自覺反應

## Zostrix0.025%

A - 4h	2	1	0	0	0						
A - 1h	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B - 4h	3	1	0	0	0						
B - 1h	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C - 4h	2	0	0	0	0						
C - 1h	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D - 4h	4	2	2	1	0						
D - 1h	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
E - 4h	3	1	0	0	0						
E - 1h	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F - 4h	3	1	0	0	0						
F - 1h	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## Zostrix0.075%

A - 4h	5	3	1	0	0						
A - 1h	5	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0
B - 4h	5	2	0	0	0						
B - 1h	5	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C - 4h	5	3	1	1	0						
C - 1h	5	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
D - 4h	5	4	3	2	0						
D - 1h	5	5	4	3	0	0	0	0	0	0	0
E - 4h	5	2	0	0	0						
E - 1h	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
F - 4h	5	2	0	0	0						
F - 1h	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0

## Zoscum 0.025%

A - 4h	6	4	1	0	0						
A - 1h	7	6	4	2	0	0	0	0	0	0	0
B - 4h	6	3	0	0	0						
B - 1h	3	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C - 4h	6	4	2	1	0						
C - 1h	7	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
D - 4h	6	5	2	1	0						
D - 1h	7	7	5	3	0	0	0	0	0	0	0
E - 4h	7	3	1	1	1						
E - 1h	5	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0
F - 4h	4	1	0	0	0						
F - 1h	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0

## Capsaicin 0.075%

A - 4h	4	2	0	0	0						
A - 1h	4	6	4	1	0	0	0	0	0	0	0
B - 4h	5	1	0	0	0						



B - 1h	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C - 4h	3	2	0	0	0						
C - 1h	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D - 4h	4	3	1	0	0						
D - 1h	6	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0
E - 4h	6	2	0	0	0						
E - 1h	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F - 4h	3	0	0	0	0						
F - 1h	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Capsaicin0.025% / CMCNa 6%

A - 4h	4	3	0	0	0						
A - 1h	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B - 4h	3	4	0	0	0						
B - 1h	4	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C - 4h	7	5	3	1	0						
C - 1h	6	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
D - 4h	4	3	2	2	0						
D - 1h	8	7	5	3	2	0	0	0	0	0	0
E - 4h	6	2	0	0	0						
E - 1h	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
F - 4h	4	2	0	0	0						
F - 1h	8	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0

Capsaicin0.075% / CMCNa 6%

A - 4h	7	6	3	0	0						
A - 1h	5	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0
B - 4h	5	3	0	0	0						
B - 1h	5	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C - 4h	5	3	0	0	0						
C - 1h	6	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0
D - 4h	5	4	3	1	0						
D - 1h	7	6	4	3	2	0	0	0	0	0	0
E - 4h	5	0	0	0	0						
E - 1h	6	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0
F - 4h	4	1	0	0	0						
F - 1h	8	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0

NVA0.025% / CMCNa 6%

A - 4h	5	4	1	0	0						
A - 1h	8	7	5	3	1	0	0	0	0	0	0
B - 4h	7	2	0	0	0						
B - 1h	6	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C - 4h	5	2	0	0	0						
C - 1h	7	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0
D - 4h	4	3	3	1	0						
D - 1h	6	5	3	2	1	0	0	0	0	0	0

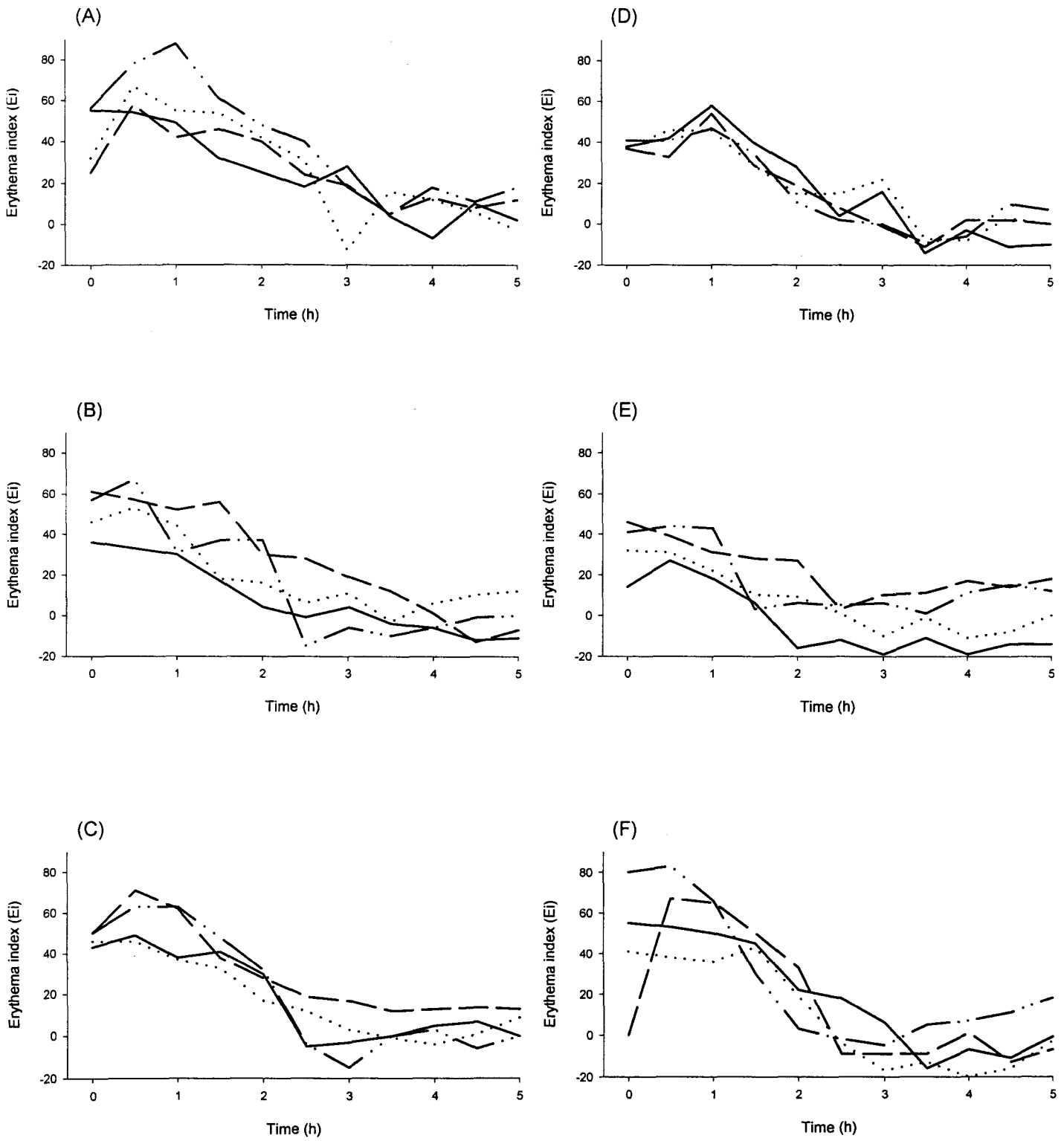
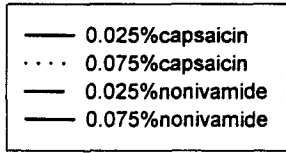
E - 4h	8	1	1	0	0							
E - 1h	7	6	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
F - 4h	5	1	0	0	0							
F - 1h	9	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NVA0.075% / CMCNa 6%												
A - 4h	6	5	2	0	0							
A - 1h	7	6	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
B - 4h	6	2	0	0	0							
B - 1h	8	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C - 4h	3	2	0	0	0							
C - 1h	6	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D - 4h	7	6	4	1	0							
D - 1h	5	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
E - 4h	4	0	0	0	0							
E - 1h	9	7	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
F - 4h	5	1	0	0	0							
F - 1h	10	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

的釋出不受塗敷劑量及其配方法決定。

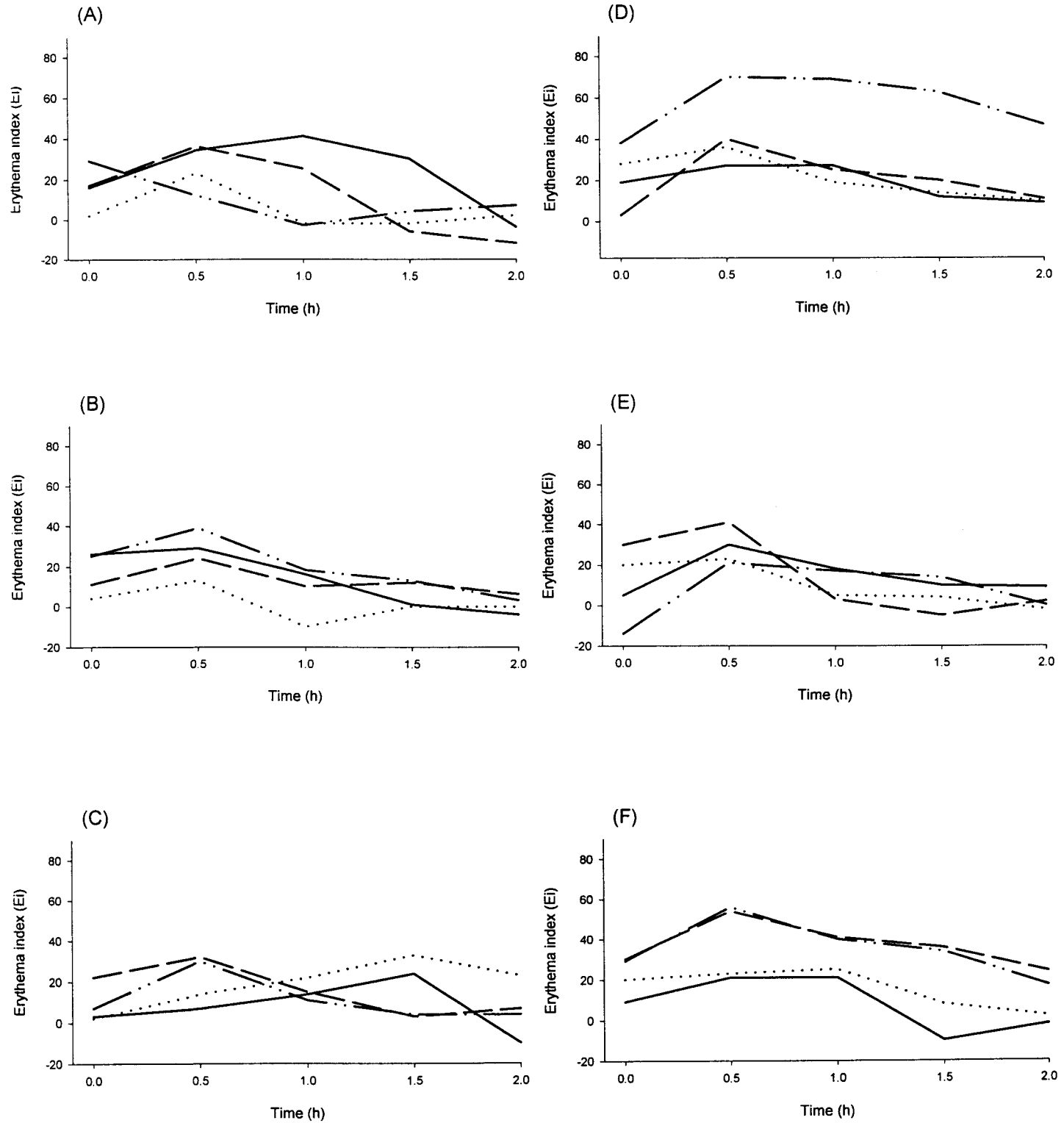
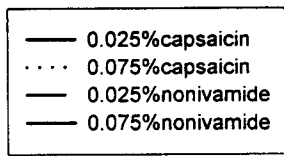
含辣椒素及 nonivamide 的 CMCNa 水性凝膠，在受試者皮膚塗敷一小時，除受試者 D 外，0.5 小時內皆達最高量，如圖十五所示，除掉水性凝膠 2.5-3 小時後，皮膚紅斑降低至正常值，所有受試者皆紀錄 CMCNa 水性凝膠的辛辣感比霜劑基劑強。與霜劑基劑的資料相比，CMCNa 水性凝膠可使辣椒素及 nonivamide 的釋出開始較早且持續較久。一般而言，含 0.025% 辣椒素之 CMCNa 水性凝膠製劑，其  $Ei_{max}$  是比 0.025% Zostrix<sup>®</sup> 高，另一方面，含 0.075% 辣椒素的水性凝膠製劑，其  $Ei_{max}$  值與含 0.025% 辣椒素相近。在先前體外穿透試驗及體內角質層中一小時累積量，可反應這些配方所誘發的體內皮膚紅斑結果。

在塗敷 0.025% 及 0.075% nonivamide 之 CMCNa 水性凝膠一小時後，角質層中累積量類似於辣椒素，致使受試者 E 及 F 有近似的皮膚紅斑。雖然角質層中，nonivamide 累積量低於水性凝膠塗敷一小時後的辣椒素累積量，而  $Ei_{max}$  值，在 0.025% 及 0.075% 製劑中則呈現相反的結果，此即意涵在水性凝膠中，Nonivamide 在人體皮膚所誘發的皮膚紅斑顯著高於辣椒素所誘發之反應。

在自覺反應方面受試者無法區別含不同辣椒素及 nonivamide 濃度的四種 CMCNa 水性凝膠辛辣感程度，除此之外大部分受試者報告，nonivamide 塗敷部位辛辣感比辣椒素不為持續較久。



圖十五 Skin erythema - CMCNa 水性凝膠投與一小時之發紅現象



圖十六 Skin erythema - CMCNa 水性凝膠投與四小時之發紅現象

三分之一受試者顯示，在塗敷水性凝膠四小時後，0.025%辣椒素的皮膚紅斑比 0.075%辣椒素高（受試者 A, B）。2/3 的受試者顯示在不同含量的辣椒素間，其紅斑反應類似（圖十六）。在塗敷四小時後，0.025% Zostrix 的  $E_{i_{max}}$  值，一般大於含 0.025%辣椒素的水性凝膠，此可能由於在局部塗敷的後期，角質層中的辣椒素會有吸收延緩之現象。塗敷 nonivamide 的皮膚紅斑，所有受試者在四小時去除水性凝膠後的 0.5 小時 E 值最大，低濃度及高濃度 nonivamide 間的紅斑則無顯著趨勢。比較塗敷四小時後，nonivamide 和辣椒素的紅斑程度，大部分受試者（三分之二）顯示 nonivamide(0.025%及 0.075%)的  $E_{i_{max}}$  值較高，剩下的三分之一受試者，在塗敷 nonivamide 和辣椒素間的皮膚  $E_{i_{max}}$  值類似，這表示在短期和長期給藥期間後，nonivamide 的皮膚紅斑較辣椒素強。

### 結論和建議

1. 市售霜劑中國產中化之辣椒素霜劑之經皮膚吸收效果較美國原廠為佳，而造成皮膚發紅之現象則較原廠稍高，而國產汎生之辣椒素霜劑的皮膚吸收則明顯較原廠同濃度者為低。

2. 一系列自製水性凝膠中，以 chitosan 及 CMC 之釋出辣椒素效果最佳，而無論於生體外及生體內試驗其穿透皮膚效果皆較市售處方為佳。
3. 合成辣椒素 nonivamide 之經皮吸收能力較辣椒素稍低，而於人體皮膚造成之發紅程度也較辣椒素稍強，但是由於 nonivamide 之價格較天然物抽取之純粹辣椒素低廉許多，且其藥理活性不遜於天然辣椒素，因此可嘗試為辣椒素之替代藥物。
4. 由此計畫研究成果可知水性凝膠較市售霜劑之效果為高，現有市售處方並未出現類似水性凝膠之產品，因而此計畫之相關資料及成果可提供給予國產藥廠參考研發，除可降低辣椒素之劑量以節省成本而達到與霜劑相同效果，且外觀透明質感佳，製備過程簡便。
5. 國內辣椒素類之製劑依現有法規只能作為非處方藥品，但是美國等國家皆已開放此類製劑可做為處方用藥，近幾年辣椒素在神經學、藥學及臨床應用上之研究迭有新的發展，期望貴署重新考慮有關辣椒素之限制規定是否有修訂之必要。

## 参考文献

- Agner T, Serup J, Individual and instrumental variations in irritant patch-test reactions — Clinical evaluation and quantification by bioengineering methods, *Clin. Exp. Dermatol.* 15 (1990) 29-33.
- Anand P, Bloom SR, and McGregor GP: Topical capsaicin pretreatment inhibits axon reflex vasodilation caused by somatostatin and vasoactive intestinal peptide in human skin. *Brit. J. Pharmacol.* 1983; 78:665-9
- Aspe E, Guy RH, Lee WA, Kennedy JA, Visor GC, Ennis RD: Optimization of in vitro flux through hairless mouse skin of cidofovir, a potent nucleotide analog. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84 :750-4.
- Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T, Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats, *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 189- 98.
- Bernastein JE, Swift RM, Soltani K, and Lorincz AL: Inhibition of axon reflex vasodilation by topically applied capsaicin. *J. Invest. Dermatol.* 1981; 76:394-5
- Bjerring P, and Arendt-Nielsen L: Inhibition of histamine skin flare reaction following repeated topical application of capsaicin. *Allergy.* 1990; 45: 121-5
- Buck SH, and Burks TF: The neuropharmacology of capsaicin-review of some recent observations. *Pharmacol. Rev.* 1986; 38: 179-226
- Bucsis A, and Lembeck F: In vitro release of substance P from spinal



cord slices by capsaicin congeners. *Eur. J. Pharmacol.*, 1987; 71: 71-77

Chambin-Remoussenard O, Treffel P, Bechtel Y, Agache P: Surface recovery and stripping methods to quantify percutaneous absorption of caffeine in humans. *J. Pharm. Sci.* 1993; 82: 1099-101

Chen IJ, Yang JM, Yeh JL, Wu BN, Lo YC, Chen SJ, Hypotensive and antinociceptive effects of ether-linked and relatively non-pungent analogues of N-nonanoyl vanillylamide, *Eur. J. Med. Chem.* 27 (1992) 187- 92.

Chien YW, Keshary PR, Huang YC, and Sarpotdar PP: Comparative controlled skin permeation of nitroglycerin marketed transdermal delivery system. *J. Pharm. Sci.* 1983; 72: 968-9

Chien YW: Logic of transdermal controlled drug administration. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983; 9: 497-520

Chien YW: Pharmaceutical considerations of transdermal nitroglycerin delivery- The various approaches. *Am. Heart J.* 1984; 108: 207-16

Doelker E: Water-swollen cellulose derivatives in pharmacy. In: N.A. Peppas (Eds.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy. Vol. II: Polymers.* CRC Press, Boca Raton, FL, 1987; pp:115-60.

Fang JY, Wu PC, Huang YB, Tsai YH, In vitro permeation study of capsaicin and its synthetic derivatives from ointment bases using various skin types, *Int. J. Pharm.* 126 (1995) 119-128.

Fang JY, Ko CT, Huang YB, Wu PC, Tsai YH, Transdermal delivery of sodium nonivamide acetate from volatile vehicles: effects of polymers, *Int. J. Pharm.* 176 (1999) 157-167.

Foreman JC, Jordan CC, Oehme P, and Renner H: Structure-activity

relationships for some substance P related peptides that cause wheal and flare reactions in human skin. *J. Physiol. (Lond.)* 1983; 335: 449-65

Fuji T, Ohbuchi Y, Takahashi S, Sakrada S, Ando R, and Kisara K: Studies on the hypothermic response of capsaicin and its analogue in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1986; 280: 165-76

Inagi T, Muramatsu T, Nagai H, Terada H, Influence of vehicle composition on the penetration of indomethacin through guinea pig skin, *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981) 1708-1714

Gamse R: Capsaicin and nociception in the rat and mouse. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1982; 320: 205-16

Gasparovic I, Hadzovic S, Hukovic S, and Stern P: Contribution to the theory that substance P has a transmitter role in sensitive pathway. *Med. Exp.* 1964; 10: 303-6

Hayes AG, Skingler M, Tyers MB: Effects of single dose of capsaicin on nociceptive thresholds in the rodents. *Neuropharmacology* 1981; 20 :505-511

Hayes AG, Orford A, Reynolds M, Skingler AH, Skingler M, Smith C, and Tyers MB: The effects of a series of capsaicin analogues on nociception and body temperature in the rats. *Life Sci.*, 1984; 34: 154-156

Ho HO, Huang FC, Sokoloski TD, Sheu MT: The influence of cosolvents on the in-vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from a gel system. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46 :636-42.

Izumi H, and Karita K: Investigation of mechanisms of the flare and wheal reactions in human skin by band method. *Brain Res.* 1988;

449: 328-31

Jancso G, Obal F, Toth-Kasa I, Katona M, and Husz S. The modulation of cutaneous inflammatory reactions by peptide-containing sensory nerves. *Int. J. Tissue React.* 1985; 7: 449-57

Jones DS, Woolfson AD, Brown AF, Textural: Viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers, *Int. J. Pharm.* 1997; 151 :223-33.

Jones ECS, and Pyman FL: The relation between chemical constitution and pungent in acid amides. *J. Chem. Soc.* 1925; 127: 2588-9

Juhasz K, and Tyirak E: Pungent substance in the fruit of capsicum genus. *Acta agron.* 1969; 18: 113-20

Karim A: Transdermal absorption-a unique opportunity for constant delivery of nitroglycerin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983; 9: 671-89

Kligman AM: A biological brief on percutaneous absorption. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983; 9: 521-60

Lahann TR, and Farmer RW: Antinociceptive action of capsaicin in rodents. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1982; 26: 145-9

Lee CK, Kitagawa K, Uchida T, Kim NS, Goto S: Transdermal delivery of theophylline using an ethanol/Panasate 800-ethylcellulose gel preparation *Biol. Pharm. Bull.* 1995; 18 : 176-80.

Lin SY, Lin PC: Effect of acid type, acetic acid and sodium carboxymethyl cellulose concentrations on the formation, micromeritic, dissolution and floating properties of theophylline chitosan microcapsules. *Chem. Pharm. Bull.* 1992; 40 :2491-7.

Lu JX, Prudhommeaux F, Meunier A, Sedel L, Guillemin G, Effects of chitosan on rat knee cartilages, *Biomaterials* 20 (1999) 1937-1944.

- McCusker MT, Chung KF, Roberts NM, Barnes PJ: Effect of topical capsaicin on the cutaneous responses to inflammatory mediators and to antigen in man. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989; 83: 1118-24
- Monserenusorn Y, Kongsamut S, and Pezalla P: Capsaicin- a literature survey. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1982; 13: 321-39
- Narasimhan B, Peppas NA: Molecular analysis of drug delivery systems controlled by dissolution of the polymer carrier. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86 :297-304.
- Negulesco JA, Noel SA, Newman JAI, Nabor EC, Bhat HB and Witiak DT: Effects of pure capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin) on plasma lipid and lipoprotein concentrations of turkey poult. *Athero.* 1987; 64: 85-90
- Nelson EK, Dawson LE: The constitution of capsaicin-the pungent principle of capsicum, part 2. *J. Am. Chem. Soc.* 1923; 45: 2179-81
- Nelson EK: Vanillyl-acylamide. *J. Am. Chem. Soc.* 1919; 41: 2121-30
- Northan WJ, and Jones DJ: Comparison of capsaicin and substance P induced cyclic AMP accumulation in spinal tissue slices. *Life Sci.* 1984; 35: 293-302
- Roberts RGD, Westerman RA, Widdop RE, Kotzmann RR, Payne R, Effects of capsaicin on cutaneous vasodilator response in humans, *Agents Actions* 37 (1992) 53-59.
- Shah VP et. al.: Bioequivalence of topical dermatological dosage forms: methods of evaluation of bioequivalence. *Pharm. Res.* 1998; 15: 167-71
- Shin SC, Cho CW, Choi HK, Permeation of piroxicam from the poloxamer gels, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 273-278.

- Simone DA, Ochoa J: Early and late effects of prolonged topical capsaicin on cutaneous sensibility and neurogenic vasodilation in humans. *Pain*. 1991; 47 : 285-94.
- Szolcsanyi J, and Jancso-Gabor A: Sensory effects of capsaicin congeners part 1: relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agent. *Arzneim-Forsch (Drug Res.)* 1975; 25: 1877-81
- Szolcsanyi J: Antidromic vasodilation and neurogenic inflammation. *Agent Actions*. 1988; 23: 4-11
- Toh CC, Lee TS, and Kiang AK: The pharmacological actions of capsaicin and analogues. *Br. J. Pharmacol.* 1954; 10: 175-82
- Toth-Kasa J, Jancso G, Boegnar A, and Obal F: Capsaicin prevents histamine-induced itching. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 1986; 6: 163-9
- Tsai CJ, Hsu LR, Fang JY, Lin HH: Chitosan hydrogel as a base for transdermal delivery of berberine and its evaluation in rat skin. *Biol. Pharm. Bull.* 1999; 22:397-401.
- Tsai YH, Huang YB, Fang JY, Wu PC, Percutaneous absorption of capsaicin and its derivaives, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20 (1994) 719-730.
- Wallengren J, and Moller H: The effect of capsaicin on some experimental inflammations in human skin. *Acta. Derm. Venereol. (Stockh.)*. 1986; 66: 375-80
- Wang JP, Hsu MF, Teng CM: Antiplatelet effect of capsaicin. *Thromb. Res.* 1984; 36 : 497-507.