

乳香没药精油自微乳的制备与抗炎镇痛作用评价

黎 鹏¹, 程永婷², 马 峰¹, 任成波¹, 孙建伟³, 张 敬¹

1. 河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000

2. 河北北方学院, 河北 张家口 075000

3. 中国人民解放军陆军解放军第81集团军医院, 河北 张家口 075000

摘要: 目的 制备乳香没药精油(FMO)自微乳化给药系统(FMO-SMEDDSs), 并评价其抗炎镇痛效果。方法 水蒸气蒸馏法提取FMO, 考察FMO与不同种类油相、乳化剂和助乳化剂的配伍相容性并确定了FMO-SMEDDSs的处方组成, 最终根据伪三元相图法得到其处方配比; 以热力学稳定性、动态光散射、透射电镜等实验手段评价FMO-SMEDDSs的理化性质。将SD大鼠随机分为5组: 对照组、模型组、布洛芬(阳性药, 20 mg·kg⁻¹)组、FMO(生药剂量 90 mg·kg⁻¹)组、FMO-SMEDDSs(90 mg·kg⁻¹)组, 每天ig给药2次, 连续给药7 d, 对照组与模型组ig生理盐水; 除对照组外, 其余4组大鼠均在右后足跖sc 40.0% 甲醛溶液 0.1 mL, 6 h后用千分尺测量大鼠右后足厚度, 并计算肿胀度和肿胀抑制率; ELISA试剂盒分别检测致炎足底组织中前列腺素E₂(PGE₂)水平, 血清白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。通过小鼠扭体法评价布洛芬(40 mg·kg⁻¹)组、FMO(180 mg·kg⁻¹)组、FMO-SMEDDSs(180 mg·kg⁻¹)的镇痛效果。结果 根据配伍相容性及伪三元相图结果, 分别选择肉豆蔻酸异丙酯(IPM)、聚山梨酯80和异丙醇作为FMO-SMEDDSs的油相、乳化剂和助乳化剂, 配比为4:4:2; FMO-SMEDDSs形成的微乳平均粒径为(57.8±1.1) nm, PDI为(0.216±0.014), Zeta电位为(-11.5±0.05) mV, 在透射电镜下可观察到微乳呈球状, FMO-SMEDDSs热力学稳定性良好。与模型组比较, 布洛芬、FMO、FMO-SMEDDSs组大鼠的致炎足肿胀度及肿胀率均显著降低($P<0.05$), PGE₂、TNF-α和IL-6水平显著降低($P<0.05$); 与FMO组比较, FMO-SMEDDSs组大鼠致炎足肿胀度及肿胀率进一步显著降低($P<0.05$), PGE₂、TNF-α和IL-6水平进一步显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, ig布洛芬、FMO以及FMO-SMEDDSs后均能显著延长小鼠扭体反应潜伏期, 显著减少15 min内的扭体次数($P<0.05$); 相对于FMO组, FMO-SMEDDSs抑制小鼠扭体反应作用更明显。结论 成功制备FMO-SMEDDSs, 其具有良好的抗炎镇痛的作用。

关键词: 乳香没药精油; 自微乳化给药系统; 伪三元相图法; 抗炎镇痛; 前列腺素E₂; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子-α

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)04-0795-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.04.013

Preparation of frankincense and myrrh essential oils self microemulsifying drug delivery systems and evaluation of its anti-inflammatory and analgesic effects

LI Peng¹, CHENG Yongting², MA Feng¹, REN Chengbo¹, SUN Jianwei³, ZHANG Jing¹

1. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

2. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

3. The 81st Army Group Hospital of the PLA, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: Objective To prepare frankincense and myrrh essential oils (FMO) self microemulsifying drug delivery systems (FMO-SMEDDSs) and evaluate their anti-inflammatory and analgesic effects. **Methods** The FMO was extracted by steam distillation method. The formulation composition of FMO-SMEDDSs was determined by investigating its compatibility with different oil phases, emulsifiers and co-emulsifiers. Finally, the formulation proportion of FMO-SMEDDSs was obtained according to the pseudo ternary phase diagram method. The physical and chemical properties of FMO-SMEDDSs were evaluated by thermodynamic stability, dynamic light scattering and transmission electron microscopy. SD rats were randomly divided into five groups: control group, model group, ibuprofen (positive drug, 20 mg·kg⁻¹) group, FMO (crude drug dose, 90 mg·kg⁻¹) group, and FMO-SMEDDSs

收稿日期: 2022-10-26

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目(2019181)

第一作者: 黎 鹏, 研究方向为手足综合征的综合治疗。E-mail: 541334547@qq.com

(90 mg·kg⁻¹) group. Rats were ig administered twice daily for seven consecutive days. Rats in control group and model group were ig administered with saline. Except for the control group, 0.1 mL of 40.0% formaldehyde solution was injected into the right hind foot of rats in the other four groups. After six hours, the thickness of the right hind foot of the rats was measured with a micrometer, and the swelling degree and swelling inhibition rate were calculated. The levels of prostaglandin E₂ (PGE₂), serum interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the inflammatory plantar tissue of the foot were detected by ELISA kit method. Meanwhile, the analgesic effect of ibuprofen (positive drug, 20 mg·kg⁻¹), FMO (crude drug dose, 90 mg·kg⁻¹), and FMO-SMEDDSs (crude drug dose, 90 mg·kg⁻¹) was evaluated by mouse twisting metho. **Results** According to the compatibility and pseudo ternary phase diagram, isopropyl myristate (IPM), Tween 80 and isopropanol were selected as the oil phase, emulsifier and co emulsifier of FMO-SMEDDSs, with the ratio of 4: 4: 2. The average particle size of microemulsion formed by FMO-SMEDDSs was (57.8±1.1) nm, PDI was (0.216±0.014), and Zeta potential was (-11.5 ± 0.05) mV. Under the transmission electron microscope, it could be observed that the microemulsion was spherical. Compared with the model group, the inflammatory foot swelling degree and swelling rate of rats in the ibuprofen, FMO, and FMO-SMEDDSs groups were significantly reduced ($P < 0.05$), PGE₂, IL-6, and TNF- α levels significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the FMO group, the degree and rate of swelling of the inflamed feet in the FMO-SMEDDSs group were further significantly reduced ($P < 0.05$), PGE₂, IL-6, and TNF- α levels significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, ig ibuprofen, FMO, and FMO-SMEDDSs significantly prolonged the latency of writhing reaction in mice and significantly reduced the number of writhing times within 15 min ($P < 0.05$). Compared with FMO group, FMO-SMEDDSs had a more significant inhibitory effect on mouse torsion response. **Conclusion** FMO-SMEDDSs have been successfully prepared and have good anti-inflammatory and analgesic effects.

Key words: frankincense and myrrh essential oils; self microemulsifying drug delivery systems; pseudo ternary phase diagram method; anti inflammatory and analgesic; prostaglandin E₂; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

乳香为橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 皮部渗出的树脂, 没药为橄榄科植物地丁树 *Commiphora myrrha* Engl. 的干燥树脂, 乳香和没药是临床上常用的散瘀定痛、消肿生肌的“外伤要药”, 在合用时(一般为 1:1)具有良好的协同作用^[1-2]。现代药理学研究表明, 乳香和没药中的精油是产生抗炎镇痛作用的主要活性成分^[3]。然而, 与其他精油一样, 乳香没药精油(frankincense and myrrh essential oils, FMO)也存在化学性质不稳定、极易挥发, 难溶于水, 口服生物利用度低, 对胃肠道有刺激性等缺点^[4], 限制了其临床应用^[5]。自微乳化给药系统(SMEDDSs)是由药物、油、乳化剂和助乳化剂组成的各相同性混合物, 在水性介质中经温和搅拌即可自发形成水包油(O/W)型纳米级(< 500 nm)微乳^[6]。SMEDDSs作为植物精油良好的载体, 在提高精油的水溶性和稳定性, 促进药物吸收等方面具有显著优势^[7]。为此, 本研究制备FMO自微乳化给药系统(FMO-SMEDDSs), 以改善FMO易挥发、不稳定等问题, 并通过甲醛致炎法^[8]和小鼠扭体法^[9]评价FMO-SMEDDSs的抗炎、镇痛效果, 为后续进一步开展临床研究提供参考。

1 材料

1.1 药材及主要试剂

乳香购自河北政通药业有限公司, 经河北北方学院程永婷讲师鉴定为橄榄科植物乳香树 *B.*

carterii Birdw. 的干燥树脂; 没药购自河北政通药业有限公司, 经河北北方学院程永婷讲师鉴定为橄榄科植物地丁树 *C. myrrha* Engl. 的干燥树脂; 油酸乙酯(成都华邑药用辅料制造有限责任公司, 批号210513); 肉豆蔻酸异丙酯(IPM, 江苏东南纳米材料有限公司, 批号Z201114); 蓖麻油(南京威尔药业集团股份有限公司, 批号21S210423); 大豆油(江西益普生药业有限公司, 批号13S211201); 聚乙二醇-15羟基硬脂酸酯(Solutol HS 15, 嘉法狮贸易有限公司, 批号541241); 聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL, 南京威尔药业集团股份有限公司, 批号03C220116); 聚山梨酯80(Tween 80, 南京威尔药业集团股份有限公司, 批号13T211108); 聚乙二醇400(PEG400, 山东瑞生药用辅料有限公司, 批号20210219); 异丙醇(中国医药集团有限公司, 批号211104); 前列腺素E₂(PGE₂)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA试剂盒(上海科艾博生物技术有限公司); 40.0% 甲醛溶液(自制, 批号20220512); 1.0% 醋酸溶液(自制, 批号20220526); 布洛芬片(新华制药股份有限公司, 批号210113)。

1.2 主要仪器

3-16R型台式高速冷冻离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司); Malvern Zetasizer Nano S90纳米粒度电位仪(英国Malvern公司); JEM-2100透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

1.3 实验动物

SPF级30只SD大鼠,体质量为220~240 g,雌雄各半,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2020-0004。SPF级昆明种小鼠24只,体质量18~24 g,雌雄各半,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2020-0004。本试验严格按照动物实验伦理要求进行操作,且通过河北北方学院附属第一医院伦理委员会审批同意(动物伦理号LAC2021033)。

2 方法与结果

2.1 水蒸气蒸馏法提取FMO^[10]

取乳香和没药,粉碎后分别过30目筛网,称取2种药物粗粉各500 g加入到蒸馏烧瓶中,再加入5倍量水浸泡30 min,开始加热蒸馏,收集馏分至油层不再增加,分离油层,加入适量无水硫酸钠脱水,滤过,即得到黄绿色FMO,计算精油提取率为3.54%。

2.2 互溶性考察

按照质量比为2:1称取FMO与不同油相(油酸乙酯、IPM、蓖麻油和大豆油)、乳化剂(Solutol HS 15、Cremophor EL和Tween 80)和助乳化剂(PEG400和异丙醇),加入到玻璃小瓶中,涡旋混合5 min,室温放置24 h,选出未出现分层油相、乳化剂和助乳化剂组。再将上述溶液转移至离心管中,5 000 r·min⁻¹离心10 min,取出观察溶液状态^[11],结果见表1。

由实验结果可知,FMO能够与油相中的油酸乙

表1 FMO与不同辅料的互溶性

Table 1 Miscibility of frankincense and myrrh essential oils and different excipients

种类	辅料	溶液性状	
		放置24 h	离心10 min
油相(O)	油酸乙酯	互溶	互溶
	IPM	互溶	互溶
	蓖麻油	互溶	分层
	大豆油	分层	/
乳化剂(S)	Solutol HS 15	互溶	互溶
	Cremophor EL	互溶	互溶
	Tween 80	互溶	互溶
助乳化	PEG400	分层	/
剂(CoS)	异丙醇	互溶	互溶

酯和IPM互溶,与乳化剂中的Solutol HS 15、Cremophor EL和Tween 80互溶,与助乳化剂中异丙醇互溶,且离心后均未出现分层。因此,选择油酸乙酯或IPM作为油相,Solutol HS 15、Cremophor EL或Tween 80作为乳化剂,异丙醇作为助乳化剂进行配伍相容性研究。

2.3 配伍相容性考察

分别按照质量比例为2:6:2和2:4:4(预试验得到的比例)称取选择的油相、乳化剂和助乳化剂,加入到玻璃小瓶中,涡旋混合5 min,室温放置24 h,选出未出现分层溶液转移至离心管中,5 000 r·min⁻¹离心10 min,取出观察溶液状态,结果见表2。

油相、乳化剂和助乳化剂所构成的混合物在离心平衡后,外观均呈均匀透明状,能够形成各向同

表2 不同辅料间的配伍相容性

Table 2 Compatibility between different excipients

序号	配方	配比	溶液性状	
			放置24 h	离心10 min
1	油酸乙酯-Cremophor EL-异丙醇	2:6:2	互溶	分层
2	油酸乙酯-Cremophor EL-异丙醇	2:4:4	分层	/
3	IPM-Cremophor EL-异丙醇	2:6:2	互溶	分层
4	IPM-Cremophor EL-异丙醇	2:4:4	互溶	分层
5	油酸乙酯-Tween 80-异丙醇	2:6:2	互溶	分层
6	油酸乙酯-Tween 80-异丙醇	2:4:4	分层	/
7	IPM-Tween 80-异丙醇	2:6:2	互溶	互溶
8	IPM-Tween 80-异丙醇	2:4:4	互溶	互溶
9	油酸乙酯-Solutol HS 15-异丙醇	2:6:2	分层	/
10	油酸乙酯-Solutol HS 15-异丙醇	2:4:4	分层	/
11	IPM-Solutol HS 15-异丙醇	2:6:2	互溶	分层
12	IPM-Solutol HS 15-异丙醇	2:4:4	互溶	分层

性混合物,说明相容性良好。根据相容性实验结果,本研究确定FMO-SMEDDSs的油相为IPM,乳化剂为Tween 80,助乳化剂为异丙醇。

2.4 绘制伪三元相图

按照质量比3:1、2:1和1:1称取乳化剂Tween 80和助乳化剂异丙醇,加入到西林瓶中,涡旋混合3 min,形成透明状乳化剂混合物(S_{mix}),再分别按照质量比为9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9

称取油相(O)和 S_{mix} ,涡旋混合5 min,形成透明状油状物;分别取上述溶液1 g加入到烧杯中,在 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌下向其内滴加 37°C 纯化水,记录溶液突然由透明、半透明液体变为混浊状液体的加水量,以油相、乳化剂混合物、水作为顶点,用Origin 8.0绘制伪三元相图,通过比较伪三元相图微乳面积大小,选出面积最大的配方^[12],结果见图1。

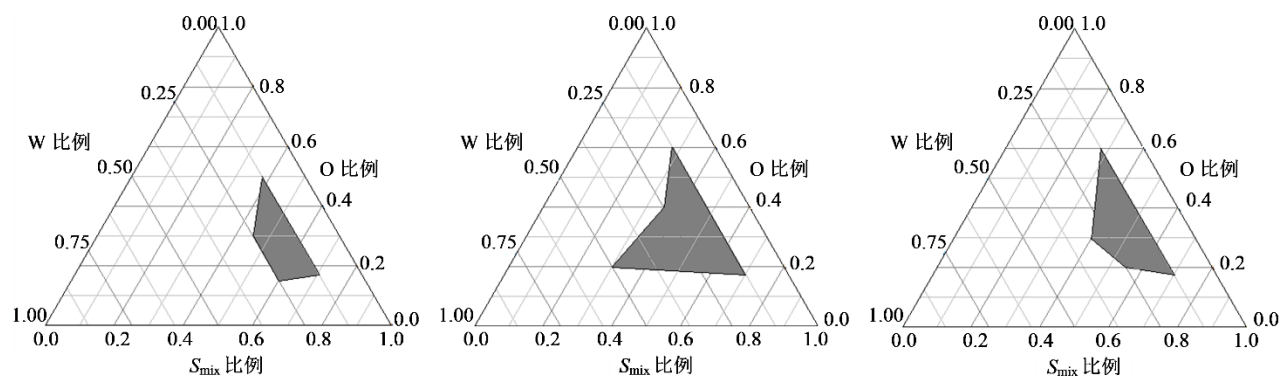


图1 油(O)/ S_{mix} /水(W)构成的伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram of oil (O)/ S_{mix} /water (W)

由伪三元相图可知,处方中乳化剂和助乳化剂比例分别为3:1、2:1和1:1对应形成的微乳面积依次约为4.5%、15.7%和7.6%,当质量比在2:1时能够形成较大的乳化区域面积,因此选择乳化剂和助乳化剂质量比为2:1作为最佳配比。最终确定FMO-SMEDDSs处方组成为:IPM为油相,Tween 80为乳化剂,异丙醇为助乳化剂,配比为4:4:2。

2.5 FMO-SMEDDSs的制备

分别称量IPM 4 g、Tween 80 4 g、异丙醇 2 g,加入到试管中,涡旋混合5 min,形成透明状油状溶液;另称取FMO 4 g加入到试管中,继续涡旋混合5 min,即得到FMO-SMEDDSs,备用。

2.6 FMO-SMEDDSs理化性质研究

2.6.1 自乳化性能考察 取FMO-SMEDDSs 0.5 g加入到100 mL水中,水温为 37°C ,同时进行磁力搅拌,速度为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,记录FMO-SMEDDSs完全形成微乳的时间,重复测定3次,取平均值。测定结果显示,FMO-SMEDDSs自乳化时间为 $(34 \pm 2) \text{ s}$,自乳化时间小于1 min,说明FMO-SMEDDSs自乳化能力较强^[13]。

2.6.2 浊点测定 取FMO-SMEDDSs 0.5 g加入到100 mL水中,搅拌形成微乳,将该溶液放入到水浴锅中,匀速搅拌,逐渐升温,记录微乳液变浑浊时的温度。重复测定3次,取平均值。测定结果显示,

FMO-SMEDDSs的浊点为 $(63.7 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,远高于人体生理温度,说明FMO-SMEDDSs在体内不存在相分离的风险^[14]。

2.6.3 热力学稳定性评价 通过反复冻融与离心实验评估FMO-SMEDDSs的热力学稳定性^[15]。(1)取适量FMO-SMEDDSs在 -20°C 冰箱中存放2 d,再存放到 40°C 稳定箱中2 d,重复进行3次冻融循环,最后将样品在 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度下离心10 min,观察是否出现相分离现象;(2)另取适量FMO-SMEDDSs置于离心管中,在 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度下离心20 min,观察是否出现相分离现象。测试结果显示,FMO-SMEDDSs经反复冻融与离心实验后,均未观察到相分离现象,说明FMO-SMEDDSs的热力学稳定性良好。

2.6.4 粒度分布与Zeta电位测定 使用Malvern Zetasizer Nano S90纳米粒度电位仪在 25°C 条件下检测FMO-SMEDDSs自乳化形成微乳的粒度分布、多聚分散系数(PDI)以及Zeta电位。取FMO-SMEDDSs 0.5 g加入50倍蒸馏水,用玻璃棒轻轻搅拌自乳化形成微乳,取样品溶液加入到聚苯乙烯样品池中,测定粒径分布及PDI,测定参数:氦氖激光器波长为633 nm,散射角为 90° ,运行时间为60 s;另取样品溶液加入到聚苯乙烯样品池中,基于多普勒电泳光散射原理测量微乳的Zeta电位。每份样品

重复测定3次,取平均值。检测结果显示,FMO-SMEDDSs自乳化形成微乳的粒度分布为 $(57.8 \pm 1.1) \text{ nm}$,PDI为 (0.216 ± 0.014) ,Zeta电位为 $(-11.5 \pm 0.05) \text{ mV}$ 。

2.6.5 微观形态观察 采用透射电子显微镜观察FMO-SMEDDSs自乳化形成微乳的微观形态,取FMO-SMEDDSs 0.2 g加入50倍蒸馏水,用玻璃棒轻轻搅拌,自乳化形成微乳,取少量微乳液滴加到200目Formvar®涂层铜网的表面,铺展,用2%磷钨酸进行染色,待样品水分蒸发后,通过透射电子显微镜观察微乳的微观形态。透射电镜照片(见图2)显示,FMO-SMEDDSs形成的微乳呈球状,表面光滑,分布均匀。

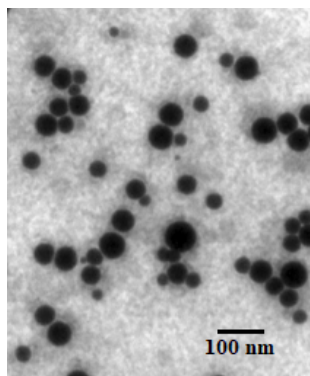


图2 FMO-SMEDDSs形成的微乳透射电镜照片

Fig. 2 TEM photos of microemulsion formed by FMO-SMEDDSs

2.7 动物药效学评价

2.7.1 统计学分析 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行统计,组间比较采用 t 检验。

2.7.2 抗炎效果评价 取30只SD大鼠,体质量为220~240 g,雌雄各半,分笼饲养3 d,适应环境。将大鼠随机分为5组:对照组、模型组、布洛芬(阳性药, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、FMO(生药剂量 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[16]

组、FMO-SMEDDSs(生药剂量 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,对照组、模型组大鼠给予生理盐水,布洛芬组大鼠给予布洛芬混悬液(将布洛芬片研成粉末,用生理盐水配制成质量浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液,给药体积为 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),每天ig给药2次,连续给药7 d。

使用千分尺测定每组大鼠右后足正常厚度,并在末次给药1 h后使用甲醛致炎(即除对照组外,其余4组大鼠均在右后足跖 40.0% 甲醛溶液 0.1 mL),在致炎后6 h用千分尺测量大鼠右后足厚度,并计算肿胀度和肿胀抑制率。

肿胀度=致炎后致炎足足围-致炎前致炎足足围

肿胀抑制率=肿胀度/致炎前致炎足足围

再将各组大鼠断颈处死,从大鼠腹主动脉取出全血2 mL,离心,取上层血清, -80°C 冰箱内保存;同时取下大鼠炎性肿胀足的足底组织,充分研碎, -80°C 冰箱内保存。使用ELISA试剂盒分别检测致炎足足底组织中 PGE_2 水平,以及血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 水平^[17]。

如表3所示,与对照组比较,模型组大鼠右后足肿胀度显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,布洛芬、FMO、FMO-SMEDDSs组大鼠的致炎足肿胀度及肿胀率均显著降低($P < 0.05$);与FMO组比较,FMO-SMEDDSs组大鼠致炎足肿胀度及肿胀率进一步显著降低($P < 0.05$)。

如表4所示,与对照组比较,模型组大鼠 PGE_2 、 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,布洛芬、FMO、FMO-SMEDDSs组 PGE_2 、 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 水平显著降低($P < 0.05$);与FMO组比较,FMO-SMEDDSs组 PGE_2 、 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 水平进一步显著降低($P < 0.05$)。

2.7.3 镇痛效果评价 取昆明种小鼠24只,雌雄各半,随机分为4组:模型组、布洛芬(阳性药, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、FMO(生药剂量 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[16]组、FMO-SMEDDSs(生药剂量 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,模型

表3 致炎大鼠右后足的肿胀抑制效果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Swelling inhibition effect of right hind foot of inflammatory rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	致炎前致炎足足围/cm	致炎后致炎足足围/cm	肿胀度/cm	肿胀抑制率/%
对照	—	2.67 ± 0.12	2.67 ± 0.12	0	—
模型	—	2.71 ± 0.09	3.59 ± 0.21	0.88^*	33.0
布洛芬	20	2.64 ± 0.10	3.01 ± 0.15	$0.37^{\#}$	$13.9^{\#}$
FMO	90	2.72 ± 0.14	3.32 ± 0.18	$0.60^{\#}$	$22.5^{\#}$
FMO-SMEDDSs	90	2.69 ± 0.11	2.96 ± 0.13	$0.27^{\#\Delta}$	$10.1^{\#\Delta}$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与FMO组比较: $^{\Delta}P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs model group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs FMO group

表4 致炎大鼠足底组织中PGE₂水平、血清中TNF- α 和IL-6水平($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 4 PGE₂ content in plantar tissue and TNF- α and IL-6 in serum of inflammatory rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PGE ₂ /(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
对照	—	319.6±61.5	231.6±49.2	96.8±23.4
模型	—	554.2±134.9*	321.9±65.4*	167.2±33.9*
布洛芬	20	376.8±93.5 [#]	246.7±52.7 [#]	124.6±28.7 [#]
FMO	90	463.9±114.4 [#]	279.1±59.5 [#]	146.1±30.6 [#]
FMO-SMEDDSs	90	366.4±91.3 ^{#△}	226.4±48.1 ^{#△}	109.1±24.7 ^{#△}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与FMO组比较: [△] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs FMO group

组小鼠给予生理盐水,每日ig给药2次,连续给药7 d。

在末次给药1 h后,各组小鼠ip 1.0%醋酸溶液每只0.2 mL,记录小鼠出现扭体反应的潜伏期以及在15 min内的扭体次数,并计算小鼠扭体反应的抑制率^[18]。

抑制率=(模型组扭体反应次数-给药组扭体反应次

数)/模型组扭体次数

如表5所示,与模型组比较,给予布洛芬、FMO以及FMO-SMEDDSs后均能显著延长小鼠扭体反应潜伏期,显著减少15 min内的扭体次数($P<0.05$);而相对于FMO组,FMO-SMEDDSs抑制小鼠扭体反应作用更明显。

表5 小鼠扭体反应实验结果($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 5 Results of writhing test in mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	扭体反应潜伏期/min	扭体反应次数	扭体反应抑制率/%
模型	—	4.3±1.2	31.5±4.6	—
布洛芬对照	40	8.8±1.7 [#]	15.4±3.2 [#]	51.1
FMO	180	8.1±2.1 [#]	18.2±3.8 [#]	42.2
FMO-SMEDDSs	180	9.2±1.9 [#]	13.6±3.4 [#]	56.8

与模型组比较: [#] $P<0.05$ [#] $P<0.05$ vs model group

3 讨论

乳香、没药中的精油需要通过提取得到,不同的提取工艺对精油的提取率会产生一定的影响。其中,潘娅^[19]考察了微波法提取乳香、没药挥发油工艺,其平均提取率达到了4.34%;李芬^[20]采用水蒸汽蒸馏法,通过比较单独提取乳香、没药与混合提取乳香、没药的药物提取率,发现单提效果更佳。本研究采用水蒸气蒸馏法从乳香和没药中提取了FMO,提取率达到了3.54%,虽然没有微波法提取率高,但是水蒸汽蒸馏法操作简单,不需要特殊设备,因此本研究采用水蒸汽蒸馏法提取FMO。

根据FMO的药理活性及其药物理化性质,研究人员已将其制备成 β -环糊精包合^[15]、固体脂质纳米粒^[21]等,以提高药物治疗作用;同时研究人员也发现FMO具有经皮给药促渗剂作用^[22]。本研究将FMO制备自微乳化给药系统,首先根据FMO与不同种类油、乳化剂和助乳化剂的相容性,确定了以油酸乙酯作为油相,Tween 80作为乳化剂,异丙醇

作为助乳化剂,并通过伪三元相图法获得FMO-SMEDDSs处方配比,其IPM:Tween 80:异丙醇比例为4:4:2;制备的FMO-SMEDDSs自乳化时间短,热力学稳定性好,形成的微乳粒径小且均匀,为开展动物药效学研究奠定了基础。

分别通过大鼠右后足跖皮下注射甲醛致炎以及小鼠扭体反应评价了FMO-SMEDDSs的抗炎镇痛效果,实验结果显示,与模型组比较,布洛芬、FMO、FMO-SMEDDSs组大鼠的致炎足肿胀度及肿胀率均显著降低,足底组织中PGE₂水平、血清中TNF- α 和IL-6水平显著降低;给予布洛芬、FMO以及FMO-SMEDDSs后均能显著延长小鼠扭体反应潜伏期,显著减少15 min内的扭体次数。与FMO相比,FMO-SMEDDSs能够进一步降低大鼠致炎足肿胀度,进一步减少小鼠扭体次数。结果表明,布洛芬、FMO以及FMO-SMEDDSs均有良好的抗炎效果;而将FMO制备成SMEDDSs给药后,与FMO组比较,其抗炎效果更明显,这是由于FMO-

SMEDDSs 进入体内迅速形成粒径极小,比表面积极大的微乳,提高药物溶解度,促进药物吸收,药效充分发挥^[23]。

本研究仅对 FMO 自微乳化给药系统的制备工艺以及药效学进行了初步的探索性研究,而缺乏更深入的自微乳中 FMO 的存在形式以及自微乳是如何提高药物的抗炎镇痛效果探讨,接下来本课题组将对这两方面进行系统的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hu D Y, Wang C M, Li F X, et al. A combined water extract of frankincense and myrrh alleviates neuropathic pain in mice via modulation of TRPV1 [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 3710821.
- [2] 杨玲, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 熏鲁香与乳香研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(2): 1193-1205.
Yang L, Lin L F, Liu Y L, et al. Research progress of mastiche and olibanum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(2): 1193-1205.
- [3] Shi F, Zhao J H, Liu Y, et al. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 2033-2043.
- [4] 赖华彰, 陈水燕, 周伟成, 等. 纳米制剂技术改善中药精油稳定性的研究进展与思考 [J]. *中草药*, 2022, 53(2): 641-652.
Lai H Z, Chen S Y, Zhou W C, et al. Research progress and thinking on nano technology for improving stability of essential oils from traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(2): 641-652.
- [5] Gao R M, Miao X D, Sun C J, et al. Frankincense and myrrh and their bioactive compounds ameliorate the multiple myeloma through regulation of metabolome profiling and JAK/STAT signaling pathway based on U266 cells [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20 (1): 96.
- [6] Dhaval M, Vaghela P, Patel K, et al. Lipid-based emulsion drug delivery systems-a comprehensive review [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(7): 1616-1639.
- [7] El-Sayed H S, Chizzola R, Ramadan A A, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems [J]. *Food Chem*, 2017, 221: 196-204.
- [8] 万思琦, 魏宇斐, 徐延, 等. 痛舒膏巴布剂作用及致敏性研究 [J]. *河北中医*, 2017, 39(12): 1852-1856, 1912.
- [9] 任淑娟, 解娟, 魏绪仓, 等. 扁桃酸的镇痛抗炎作用研究 [J]. *中国药师*, 2017, 20(12): 2153-2155.
Ren S J, Xie J, Wei X C, et al. Study on analgesic and anti-inflammatory effect of mandelic acid [J]. *China Pharm*, 2017, 20(12): 2153-2155.
- [10] 叶航程, 黄云枫, 张永太, 等. 活络效灵丹中乳香、没药挥发油提取与包合工艺研究 [J]. *中医药信息*, 2014, 31 (5): 63-66.
Ye H C, Huang Y F, Zhang Y T, et al. Extraction and inclusion processes for volatile oil from frankincense and myrrh in Huoluo Xiaoling pill [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2014, 31(5): 63-66.
- [11] 果秋婷, 闫海英, 朱钰叶, 等. 三黄地榆油微乳凝胶的制备及其治疗烫伤药理学初探 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(8): 1674-1680.
Guo Q T, Yan H Y, Zhu Y Y, et al. Preparation of Sanhuang Diyu oil microemulsion gel and evaluation of pharmacodynamics in treating eczema [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(8): 1674-1680.
- [12] 赵小义, 白冬琴. 藤黄酸自微乳化释药系统的制备与质量评价 [J]. *西北药学杂志*, 2020, 35(1): 89-94.
Zhao X Y, Bai D Q. Preparation and quality evaluation of gambogic acid self-microemulsifying drug delivery systems [J]. *Northwest Pharm J*, 2020, 35(1): 89-94.
- [13] Hu X W, Lin C, Chen D X, et al. Sirolimus solid self-microemulsifying pellets: Formulation development, characterization and bioavailability evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2012, 438(1/2): 123-133.
- [14] Bandivadeka M M, Pancholi S S, Kaul-Ghanekar R, et al. Self-microemulsifying smaller molecular volume oil (Capmul MCM) using non-ionic surfactants: A delivery system for poorly water-soluble drug [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, 38(7): 883-892.
- [15] Kassem A A, Abd El-Alim S H, Salman A M, et al. Improved hepatoprotective activity of *Beta vulgaris* L. leaf extract loaded self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS): *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2020, 46(10): 1589-1603.
- [16] 谈英, 雷永, 周昆, 等. 乳香没药挥发油入药的 β -环糊精包合工艺及镇痛作用研究 [J]. *中国药物警戒*, 2010, 7 (7): 390-391.
Tan Y, Lei Y, Zhou K, et al. Study on preparation process of β -cyclodextrin inclusion with volatile oil of *Olibanum* and *Myrrha* and it's analgesic effect [J]. *Chin J Pharmacovigil*, 2010, 7(7): 390-391.

- [17] Halim P A, El-Nassan H B, El-Dash Y S. Design and synthesis of novel ibuprofen derivatives as selective COX-2 inhibitors and potential anti-inflammatory agents: Evaluation of PGE₂, TNF- α , IL-6 and histopathological study [J]. Med Chem, 2022, 18(4): 427-443.
- [18] 覃文玉, 杨丹淇, 张源文, 等. 白芷-川芎药对镇痛作用研究 [J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(1): 17-19.
- Qin W Y, Yang D Q, Zhang Y W, et al. Research on analgesic effects of *Chuanxiong Rhizoma-Angelicae Dahuricae Radix* herb pair [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2021, 30(1): 17-19.
- [19] 潘娅. 微波法优选乳香、没药挥发油的提取制备工艺 [J]. 广州化工, 2015, 43(1): 52-53.
- Pan Y. Microwave extraction technology of volatile oil from frankincense and myrrh [J]. Guangzhou Chem Ind, 2015, 43(1): 52-53.
- [20] 李芬. 乳香、没药中挥发油单提、混提的工艺研究 [J]. 中医药导报, 2011, 17(5): 94-96.
- Li F. Study on extraction technique for single and mixture volatile of *mastic ash* and *Myrrha* [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2011, 17(5): 94-96.
- [21] Shi F, Zhao J H, Liu Y, et al. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil [J]. Int J Nanomed, 2012, 7: 2033-2043.
- [22] 朱小芳, 罗晶, 管咏梅, 等. 乳香没药挥发油对川芎体外透皮吸收的影响及其皮肤血流促透机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 680-685.
- Zhu X F, Luo J, Guan Y M, et al. Effects of frankincense and myrrh essential oil on transdermal absorption *in vitro* of Chuanxiong and penetration mechanism of skin blood flow [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(4): 680-685.
- [23] Chhitij T, Seo J E, Keum T, et al. Optimized self-microemulsifying drug delivery system improves the oral bioavailability and brain delivery of coenzyme Q₁₀ [J]. Drug Deliv, 2022, 29(1): 2330-2342.

【责任编辑 兰新新】