

D-最优混料设计制备复方蜘蛛香凝胶贴膏及初步药效学考察

梅佳华^{1,2}, 王涛¹, 查丽春¹, 林维川¹, 颜明丽¹, 崔利利³, 马云淑^{1,2*}

1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500

2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南省南药可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650500

3. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 以剂型改造为出发点优选复方蜘蛛香凝胶贴膏(Compound Zhizhuxiang Gel Plaster, CZGP)处方, 考察单一促渗剂与二元复合促渗剂的促渗作用, 并初步考察 CZGP 与原处方香果健消片(Xiangguo Jianxiao Tablets, XJT)的镇痛作用。方法 以初黏力、持黏力、剥离强度和感官评分为评价指标, 采用 D-最优混料设计优化凝胶贴膏处方; 选择 3 种常用透皮促渗剂氮酮、丙二醇、薄荷醇, 以木香炔内酯、去氢木香内酯、橙皮苷为指标, 通过干加热透皮系统评价单一促渗剂和二元复合促渗剂的促渗作用, 筛选最优促渗剂; 通过小鼠(幼鼠)醋酸扭体实验初步评价 CZGP 与 XJT 的镇痛作用。结果 CZGP 的最佳处方为酒石酸 1.000 g、PVP K90 6.000 g、NP700 11.000 g、甘羟铝 0.800 g、甘油 35.000 g、水 21.200 g; 不同的一元促渗剂及二元促渗剂中, 以 3%丙二醇促渗作用最好, 木香炔内酯、去氢木香内酯、橙皮苷的渗透速率分别为 45.744、49.903、14.898 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, 增渗倍数分别为 1.523、1.602、2.636; CZGP 对小鼠(幼鼠)醋酸扭体具有镇痛作用, 且镇痛率高于 XJT。结论 CZGP 具有良好的体外经皮渗透性及镇痛作用, 为中药复方口服制剂改造为经皮给药制剂提供思路。

关键词: D-最优混料设计; 复方蜘蛛香; 凝胶贴膏; 体外透皮; 醋酸扭体实验; 香果健消片; 药效学; 镇痛; 初黏力; 持黏力; 剥离强度; 氮酮; 丙二醇; 薄荷醇; 木香炔内酯; 去氢木香内酯; 橙皮苷; 干加热透皮系统

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)11-3329-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.008

Pharmaceutical research of Compound Zhizhuxiang Gel Plaster by D-optimal mixture design

MEI Jia-hua^{1,2}, WANG Tao¹, ZHA Li-chun¹, LIN Wei-chuan¹, YAN Ming-li¹, CUI Li-li³, MA Yun-shu^{1,2}

1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology of University, Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicine, Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Resource, Kunming 650500, China

3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To optimize of the best prescription of Compound Zhizhuxiang Gel Plaster (复方蜘蛛香凝胶贴膏, CZGP) based on dosage form transformation, and investigated the penetration promotion effects of single and binary compound penetration enhancers, and the analgesic effects of gel plaster and Xiangguo Jianxiao Tablets (香果健消片, XJT). **Methods** Using initial adhesion, adhesion holding, peeling strength and sensory score as evaluation indexes, the optimal prescription was optimized by D-optimal mixture design. Three commonly used transdermal enhancers, azone, propylene glycol and menthol, were selected. With costunolide, dehydrocostus lactone and hesperidin as indicators, the permeation promotion effects of single and binary compound enhancers were evaluated by dry heating transdermal system and screened the best penetration enhancers. The analgesic effect of CZGP and XJT was preliminarily evaluated by acetic acid writhing experiment in mice (young mice). **Results** The best prescription of CZGP was tartaric acid 1.000 g, PVPK90 6.000 g, NP700 11.000 g, aluminum glycolate 0.800 g, glycerin 35.000 g and water

收稿日期: 2021-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82174065); 国家自然科学基金资助项目(82060723); 云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项项目(2018FF001); 云南省科学技术院重大科技专项项目(202002AA100007)

作者简介: 梅佳华(1996—), 男, 山西长治人, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。

Tel: 13546167274 E-mail: Highwaydo@163.com

*通信作者: 马云淑, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: yunshuma2@126.com

21.200 g; 3% propylene glycol is the best one for different monobasic and binary penetration enhancers, and the penetration rates of costunolide, dehydrocostus lactone and hesperidin were 45.744, 49.903 and 14.898 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, and the enhancement ratios were 1.523, 1.602 and 2.636, respectively. CZGP had analgesic effect on acetic acid writhing in mice (young mice), and the analgesic rate was better than XJT. **Conclusion** CZGP has good transdermal permeability and analgesic effect *in vitro*, which provides ideas for transforming compound oral preparations of traditional Chinese medicine into transdermal preparations.

Key words: D-optimal mixture design; Compound Zhizhuxiang; gel paste; *in vitro* transdermal; acetic acid twisting experiment; Xiangguo Jianxiao Tablets; pharmacodynamics; analgesia; initial adhesion force; the adhesion force; peel strength; azone; propylene glycol; menthol; costunolide; dehydroxylinolactone; hesperidin; dry heating through skin system

复方蜘蛛香由蜘蛛香、木香和草果 3 味中药组成, 来源于国家中药保护品种香果健消片(Xiangguo Jianxiao Tablets, XJT)。XJT 临床用于消化不良、胸满腹胀、气胀饱闷和食积腹痛, 疗效显著。现代药理研究表明, 蜘蛛香具有镇静镇痛^[1-2]、调节肠胃功能^[3-4]等作用, 木香具有镇痛作用^[5]、抗胃溃疡^[6]、改善结肠炎^[7-8]等作用, 草果具有抗炎镇痛^[9]、调节胃肠道功能^[10]等作用, 可见复方蜘蛛香在胃肠道疾病方面具有良好的开发前景。

凝胶贴膏指原料药物与适宜的亲水性基质材料经过混匀后, 涂布于背衬材料上所制成的贴膏剂^[11]。中药凝胶贴膏在胃肠道疾病、心血管疾病等方面具有广泛应用^[12], 能够克服口服给药肝脏首关效应、用药依从性差等缺点。本研究基于“剂型改造”理念和中医“内病外治”特色疗法, 将上市药 XJT 改造为小儿用复方蜘蛛香凝胶贴膏(Compound Zhizhuxiang Gel Plaster, CZGP), 发挥经皮给药制剂延长药物作用时间、减少给药次数、随时停止给药等优点, 以提高小儿用药依从性和安全性。

课题组前期进行了基于质量源于设计理念的复方蜘蛛香提取工艺研究, 本研究在此基础上, 采用 D-最优混料设计优化凝胶贴膏处方, 并考察一元促渗剂和二元复合促渗剂的促渗作用, 同时初步比较 CZGP 和 XJT 的镇痛作用, 探讨剂型改造的成效性, 也为上市中药制剂剂型改造提供思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DHC-6TL 型干加热透皮系统, Logan 公司; Agilent 1260 Series 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 初黏性测试仪、CZY-25 型持黏性测试仪, 济南三泉中石实验仪器有限公司; BLD-200N 型电子剥离试验机, 济南兰光机电技术有限公司; Infinite F50 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司。

1.2 药品与试剂

聚丙烯酸钠 NP700、甘油、酒石酸、聚乙烯吡

咯烷酮 K90 (PVP K90)、氮酮、丙二醇、薄荷醇购自上海麦克林生化科技有限公司; 对照品木香烯内酯(批号 111524-201911)、去氢木香内酯(批号 111524-201911)、橙皮苷(批号 110721-201818), 质量分数 >98%, 购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇, 色谱纯, 购自默克有限公司; 丁桂儿脐贴, 批号 20201110, 购自亚宝药业有限公司; XJT, 批号 200704, 购自云河药业有限公司; 前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 试剂盒购自联科生物技术有限公司; 复方蜘蛛香浸膏, 自制^[13]。

1.3 动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~200 g; 家兔, 雌雄各半, 体质量 3.0~3.2 kg; 昆明种小鼠, 雄性, 3 周龄, 体质量 15~17 g, 均购自斯贝福生物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2019-0010。所有动物实验遵循云南中医药大学有关实验动物管理和使用规定。

2 方法与结果

2.1 CZGP 的制备

将 1.000 g 酒石酸溶解于 21.200 g 蒸馏水中, 再加入 6.000 g PVP K90, 放置过夜, 使 PVP K90 充分溶胀作为 A 相; 将 0.800 g 甘羟铝加入 35.000 g 甘油中, 搅拌均匀, 加入 11.000 g NP700 后搅拌 10 min 作为 B 相, 将 9.000 g 复方蜘蛛香浸膏^[13]加入 B 相, 搅拌, 再将 A 相缓慢加入到 B 相中搅拌均匀, 涂布, 于 50 °C 干燥箱中干燥 1 h, 取出后, 盖上防黏层, 即得 CZGP。

2.2 CZGP 评价方法的建立

查阅文献评价方法^[14], 选择初黏力、持黏力、剥离强度和感官评分为指标, 总分为 100 分, 其中初黏力、持黏力、剥离强度各 20 分, 感官评分 40 分, 包括透布程度、均匀性、皮肤追随性、涂展性、反复粘贴性及膜残留量各 8 分。

2.2.1 初黏力、持黏力、剥离强度的测定 参照《中国药典》2020 年版第四部 0952 黏附力测定法一、

二、三法进行测定^[15]。初黏力根据黏住的最大钢球球号进行评分，持黏力根据凝胶贴膏脱落时间进行评分，剥离强度根据仪器读数进行评分。

$$\text{得分} = (\text{测得值} / \text{最大值}) \times 20$$

2.2.2 感官评分 查阅文献评价方法^[16-17]，以透布程度、均匀性、皮肤追随性、涂展性、反复粘贴性与膜残留量多指标综合评分为感官评分。评分标准见表 1。

表 1 感官指标评分标准

Table 1 Scoring standard of sensory index

指标	评分标准
透布程度	根据膏体透过背衬材料的程度分为 8 个等级：1~8 分
均匀性	根据膏体分散均匀程度分为 8 个等级：1~8 分
皮肤追随性	将凝胶贴膏贴敷于手腕，用力甩动 10 次，根据是否能够紧密贴于手腕的程度分为 8 个等级：1~8 分
涂展性	根据是否易于涂布分为 8 个等级：1~8 分
反复粘贴性及膜残留量	将凝胶贴膏反复粘贴于手背部，重复 3 次，根据膏体在手背处残留的程度分为 8 个等级：1~8 分

2.3 CZGP 处方优化

2.3.1 D-最优混料设计 单因素考察确定了最佳辅料种类及用量范围，并确定复方蜘蛛香浸膏用量为 9 g。采用 Design-Expert 软件进行 D-最优混料实验设计，确定辅料总量为 75 g (10 贴)，以透布程度 (Y₁)、均匀性 (Y₂)、皮肤追随性 (Y₃)、涂展性 (Y₄)、反复粘贴性及膜残留量 (Y₅)、初黏力 (Y₆)、持黏力 (Y₇)、剥离强度 (Y₈) 评分为指标，实验设计及结果见表 2、3。

表 2 D-最优混料实验设计

Table 2 Design of D-optimal mixture experiment

因素	基质种类	最高用量/g	最低用量/g
A	酒石酸	1.400	1.000
B	PVPK90	5.000	4.000
C	NP700	13.000	11.000
D	甘羟铝	0.800	0.200
E	甘油	41.000	37.000
F	水	26.000	20.000

2.3.2 模型拟合 采用 Design-Expert 软件对实验结果进行拟合得到方程 $Y = 326.80 A + 39.79 B + 72.77 C + 10.76 D + 38.15 E + 56.88 F$, $P = 0.0233 < 0.05$, 模型具有显著性, 失拟项不显著, 说明模型准确可靠。

2.3.3 验证实验 模型预测最优处方为酒石酸 1.000 g、PVP K90 6.000 g、NP700 11.000 g、甘羟铝 0.800 g、甘油 35.000 g、水 21.200 g, 综合评分为 76.3。结果 (表 4) 可见, 最优处方综合评分与预测值接近, 表明 D-最优混料设计具有良好的预测性。

2.4 皮肤刺激性考察

根据《中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则》, 选取健康家兔 8 只, 雌雄各半,

给药前 24 h 褪去脊柱两侧的兔毛。随机分为完整皮肤组和破损皮肤组, 采用同体左右侧自身对比法进行皮肤刺激性试验。在 2 组动物的左侧敷贴 CZGP, 右侧敷贴空白凝胶贴膏, 医用胶布固定。给药 24 h 后除去凝胶贴膏, 在 1、24、48、72 h 观察给药部位皮肤反应, 根据指导原则评分细则: “无红斑” 0 分, “无水肿” 0 分, “无刺激性” 0~0.49 分。结果 8 只家兔均未出现红斑及水肿, 总评分为 0 分, 表明 CZGP 无刺激性。

2.5 木香烯内酯和去氢木香内酯含量测定方法的建立

2.5.1 色谱条件 色谱柱 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为甲醇-水 (70:30); 检测波长 225 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL^[18]。

2.5.2 对照品溶液的制备 分别精密称取木香烯内酯、去氢木香内酯对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 18.27、17.68 mg/mL 的储备液, 分别精密吸取储备液 2.0 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 即得对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 取 CZGP 6 h 透皮接收液, 即为供试品溶液。

2.5.4 阴性样品溶液的制备 取空白凝胶贴膏 6 h 透皮接收液, 即为阴性样品溶液。

2.5.5 专属性考察 分别将对对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液按“2.5.1”项下色谱条件进样分析, 木香烯内酯、去氢木香内酯与其他组分色谱峰均达到基线分离, 阴性样品溶液无干扰 (图 1)。

2.5.6 线性关系考察 精密称取木香烯内酯、去氢木香内酯对照品适量, 分别配制成系列对照品溶液, 按照“2.5.1”项下色谱条件进样分析。以峰面积为

表3 D-最优混料实验设计与结果

Table 3 Design and results of D-optimal mixture experiment

试验号	基质用量/g						评分								
	A	B	C	D	E	F	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y _总
1	1.400	6.000	13.000	0.200	34.400	20.000	7	2	3	4	3	18.8	0.7	12.9	51.3
2	1.000	4.000	11.000	0.200	32.800	26.000	7	4	6	2	5	18.8	12.3	5.0	60.1
3	1.000	4.000	11.529	0.800	35.000	22.671	7	6	6	7	6	18.8	8.2	5.5	64.4
4	1.120	5.259	12.404	0.200	32.393	23.625	7	4	3	2	3	18.8	0.6	7.8	46.1
5	1.166	4.000	13.000	0.800	33.025	23.010	7	5	4	4	4	18.1	18.9	10.1	71.1
6	1.165	4.900	11.000	0.588	33.356	23.991	7	6	5	7	4	18.8	16.3	5.3	69.4
7	1.197	5.935	11.518	0.800	31.134	24.417	7	5	3	1	0	18.8	0.8	16.6	52.1
8	1.400	6.000	11.208	0.800	33.785	21.807	7	2	6	2	5	19.4	0.8	14.4	56.6
9	1.000	5.460	11.000	0.200	35.000	22.340	7	7	7	7	8	19.4	3.7	20.0	79.1
10	1.400	5.573	12.072	0.539	32.756	22.660	7	3	6	3	5	18.8	1.6	15.3	59.6
11	1.400	4.875	13.000	0.800	34.925	20.000	7	3	3	2	3	18.8	1.5	13.0	51.3
12	1.000	4.000	12.185	0.200	33.920	23.695	7	6	5	6	5	19.4	13.7	4.9	67.0
13	1.400	4.000	11.000	0.800	31.800	26.000	7	7	7	7	5	18.8	20.0	3.6	75.3
14	1.400	6.000	11.000	0.800	35.000	20.800	7	4	6	4	6	20.0	1.3	10.4	58.7
15	1.190	6.000	12.237	0.573	35.000	20.000	7	4	7	4	7	20.0	0.8	13.3	63.1
16	1.190	6.000	12.237	0.573	35.000	20.000	7	6	7	6	7	19.4	1.1	14.1	67.6
17	1.165	4.900	11.000	0.588	33.356	23.991	7	2	3	3	5	18.8	0.8	6.7	46.3
18	1.400	4.664	12.762	0.800	31.391	23.983	7	2	3	4	2	5.6	3.8	4.0	31.5
19	1.165	4.900	11.000	0.588	33.356	23.991	7	8	6	7	4	19.4	3.1	6.5	61.0
20	1.000	4.337	13.000	0.366	35.000	21.296	7	7	7	7	7	18.8	9.0	9.4	72.2
21	1.000	6.000	11.000	0.351	31.255	25.394	7	7	8	7	8	18.8	6.6	13.3	75.7
22	1.000	6.000	13.000	0.800	33.353	20.847	7	7	7	6	8	18.8	1.6	14.4	69.7
23	1.000	4.662	12.333	0.673	31.000	25.333	7	3	5	5	2	5.0	6.1	9.1	42.1
24	1.400	4.783	11.773	0.656	34.920	21.468	7	6	7	6	3	5.0	1.9	10.5	46.4
25	1.400	5.573	12.072	0.539	32.756	22.660	7	5	5	4	3	5.0	1.3	14.0	44.3
26	1.400	5.400	11.000	0.200	31.000	26.000	7	3	4	3	4	8.8	1.1	6.7	37.5
27	1.400	4.000	11.509	0.327	35.000	22.764	7	6	7	6	7	5.0	9.3	4.7	52.0
28	1.120	5.259	12.404	0.200	32.393	23.625	7	6	7	6	6	18.8	3.4	6.9	61.1
29	1.400	4.000	13.000	0.210	31.308	25.083	7	3	3	2	4	5.0	10.8	3.9	38.7
30	1.275	6.000	13.000	0.568	31.000	23.157	7	5	5	4	7	18.8	1.7	14.0	62.4
31	1.000	4.000	12.050	0.327	32.768	24.855	7	6	5	7	6	5.0	7.7	5.9	49.7

表4 验证实验结果

Table 4 Verification experiment results

实验号	评分									偏差/%
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y _总	
1	7	7	7	7	8	18.8	1.6	20	76.4	0.1
2	7	8	7	7	8	18.8	1.7	20	77.4	1.5
3	7	8	7	7	7	18.8	2.7	20	77.5	1.6

纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得到线性回归方程为木香烯内

酯 $Y=4.414 2 X-18.973$, $R^2=0.999 8$, 线性范围 1.90~609.00 μg/mL; 去氢木香内酯 $Y=2.920 6 X-11.737$, $R^2=0.999 8$, 线性范围 1.84~589.00 μg/mL。

2.5.7 精密度考察 分别精密吸取对照品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得木香烯内酯 RSD 为 0.18%, 去氢木香内酯 RSD 为 0.20%, 表明仪器精密度良好。

2.5.8 稳定性考察 取“2.5.3”项下供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、

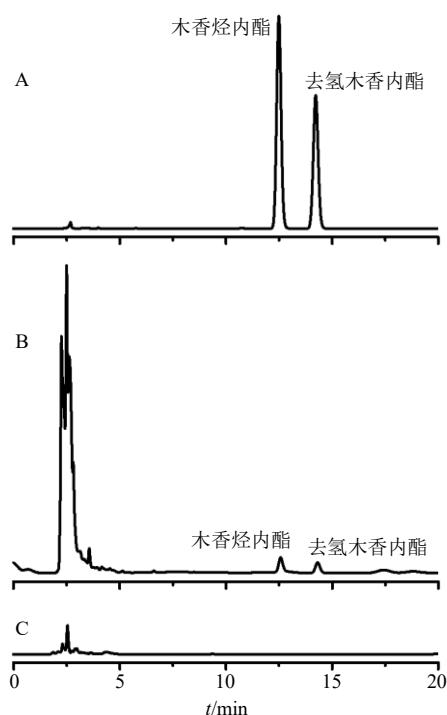


图1 混合对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances solution (A), test sample solution (B) and negative sample solution (C)

10、12、24 h 进样分析, 测得木香烯内酯 RSD 为 0.42%, 去氢木香内酯 RSD 为 0.98%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.9 重复性考察 精密量取“2.5.3”项下供试品溶液, 平行操作 6 份, 按“2.5.1”项下色谱条件进样分析, 测得木香烯内酯 RSD 为 0.14%, 去氢木香内酯 RSD 为 0.45%, 表明该方法重复性良好。

2.5.10 加样回收率考察 精密量取已测定的供试品溶液 9 份, 分别加入样品含量 50%、100%、150% 对照品溶液各 3 份, 按“2.5.1”项下色谱条件进样分析, 测得木香烯内酯、去氢木香内酯的平均加样回收率分别为 103.71%、102.75%, RSD 分别为 0.77%、0.35%, 符合要求。

2.6 橙皮苷含量测定方法的建立

2.6.1 色谱条件 色谱柱 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为乙腈-水 (26 : 74); 检测波长 283 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL^[18]。

2.6.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品适量, 加甲醇制成质量浓度 18.27 mg/mL 的储备液, 精密吸取储备液 2.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 即得对照品溶液。

2.6.3 供试品溶液和阴性样品溶液的制备 同“2.5.3”“2.5.4”项下制备方法。

2.6.4 专属性考察 分别将对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液按“2.6.1”项下色谱条件进样分析, 橙皮苷与其他组分色谱峰均达到基线分离, 阴性样品溶液无干扰 (图 2)。

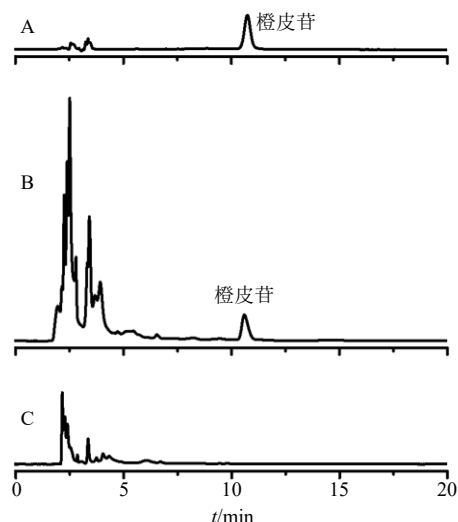


图2 对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of reference substance solution (A), test sample solution (B) and negative solution (C)

2.6.5 线性关系考察 精密称取橙皮苷对照品适量配制系列对照品溶液, 按“2.6.1”项下色谱条件进样分析。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得到线性回归方程 $Y=2.755 5 X+0.006 2$, $R^2=0.999 5$, 线性范围为 1.320~42.225 μg/mL。

2.6.6 精密度考察 精密吸取橙皮苷对照品溶液, 按“2.6.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得橙皮苷 RSD 为 0.50%, 表明仪器精密度良好。

2.6.7 稳定性考察 取“2.5.3”项下供试品溶液, 按“2.6.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样分析, 测得橙皮苷 RSD 为 1.47%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.8 重复性考察 精密量取“2.5.3”项下供试品溶液, 平行操作 6 份, 按“2.6.1”项下色谱条件进样分析, 测得橙皮苷 RSD 为 2.64%, 表明该方法重复性良好。

2.6.9 加样回收率考察 精密量取已测定的供试品溶液 9 份, 分别加入样品含量 50%、100%、150% 对照品溶液各 3 份, 按“2.6.1”项下色谱条件进样

分析,测得橙皮苷平均加样回收率为 100.19%,RSD 为 0.96%,符合要求。

2.7 体外透皮实验

2.7.1 离体皮肤的准备 SD 大鼠,雄性,脱颈椎处死后,立即剪下腹部皮肤,分离皮下组织及脂肪,用生理盐水冲洗干净,选用无破损皮肤保存备用。

2.7.2 透皮实验 取大鼠皮肤并解冻,固定在干加热自动透皮系统一端,使皮肤表层面向供给室,放置适合大小 CZGP,接收室内注满 30%乙醇生理盐水,使与真皮层密切接触,恒温于 $(32.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,600 r/min 磁力搅拌,分别在 1、2、4、6、8、10、12、24 h 将接收液全部取出,并补满原溶液体积。接收液测定木香烃内酯、去氢木香内酯和橙皮苷含量,比较氮酮、丙二醇、薄荷醇单一促渗剂和二元复合促渗剂的促渗作用。计算单位面积累积渗透量 (Q)、渗透速率 (J)、增渗倍数 (ER),绘制 $Q-t$ 曲线,结果见图 3 和表 5~7。

$$Q = \sum_{i=1}^n C_i V / A \quad (n \leq 24) \quad [19]$$

$$ER = J_s / J_0 \quad [20]$$

V 为接收液体积, C_n 为第 n 个取样点测定的药物质量浓度, A 为扩散池渗透面积, J_s 为加入促渗剂后稳态透皮速率, J_0 为未加透皮促渗剂的稳态透皮速率

结果表明,3%丙二醇对木香烃内酯和去氢木香内酯促渗作用最好,24 h 累积渗透量 Q_{24} 、渗透速率 J_{ss} 和增渗倍数 ER 均为最高。1%氮酮+1%薄荷醇对橙皮苷的促渗作用最好,3%丙二醇次之。综合 3 种成分选择 3%丙二醇作为促渗剂。

2.8 醋酸扭体实验

将 40 只昆明种小鼠(幼鼠)随机分为 4 组,每组 10 只,分别为模型组、丁桂儿脐贴组、XJT 组、CZGP 组。模型组给予空白凝胶贴膏,阳性对照组给予丁桂儿脐贴,XJT 组 ig 0.56 mg/g XJT (木香烃内酯 13.35 mg/片、去氢木香内酯 12.44 mg/片、橙皮苷 0.42 mg/片),凝胶贴膏组给予 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ CZGP (木香烃内酯 2.56 mg/贴、去氢木香内酯 3.77 mg/贴、橙皮苷 11.53 mg/贴),脐部给药,医用胶布固定,每天 1 次,连续 7 d。末次给药 2 h 后,ip 0.7% 冰醋酸 10 mL/kg,观察小鼠潜伏期及 15 min 内扭体次数,并计算镇痛率,检测小鼠血清中 PGE_2 水平,结果见表 8。

镇痛率 = (模型组平均扭体次数 - 给药组平均扭体次数) / 模型组平均扭体次数

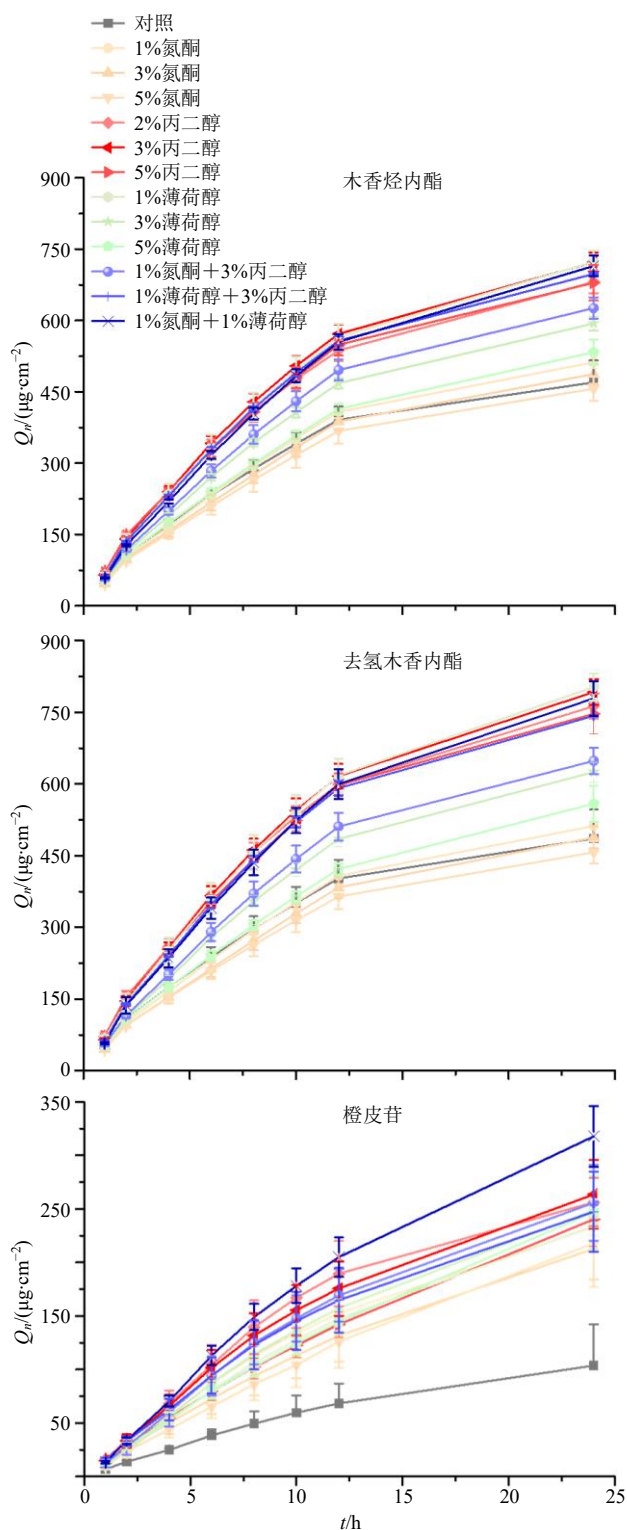


图 3 不同促渗剂对 CZGP 中 3 种成分体外经皮 $Q-t$ 曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 *In vitro* $Q-t$ curve of three components in compound spider fragrance by different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

与模型组相比,各给药组均显著延长潜伏期,减少扭体次数 ($P < 0.05$),凝胶贴膏组与 XJT 组扭

表5 不同促渗剂木香羟内酯体外 $Q-t$ 模型拟合方程 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Fitting equation of cumulative penetration models of costunolide with different penetration enhancers *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

促渗剂	拟合方程	R^2	渗透速率/ $(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
对照	$Q=30.032 t+41.647$	0.990 9	30.032	-	469.87±45.95
1%氮酮	$Q=32.084 t+32.067$	0.995 5	32.084	1.068	512.25±13.77
3%氮酮	$Q=30.210 t+30.973$	0.995 9	30.210	1.006	487.09±20.58
5%氮酮	$Q=28.506 t+32.470$	0.995 3	28.506	0.949	456.73±25.95
2%丙二醇	$Q=42.107 t+55.768$	0.986 2	42.107	1.402	680.68±27.04**
3%丙二醇	$Q=45.744 t+46.357$	0.989 9	45.744	1.523	731.48±29.46**
5%丙二醇	$Q=42.487 t+56.707$	0.990 5	42.487	1.415	679.33±37.55**
1%薄荷醇	$Q=45.047 t+44.217$	0.992 0	45.047	1.486	723.63±23.79**
3%薄荷醇	$Q=37.387 t+33.592$	0.993 8	37.387	1.245	593.60±14.32**
5%薄荷醇	$Q=32.127 t+37.303$	0.994 6	32.127	1.070	533.30±26.86**
1%氮酮+3%丙二醇	$Q=39.543 t+34.622$	0.995 0	39.543	1.317	626.07±22.53**
1%薄荷醇+3%丙二醇	$Q=44.648 t+42.789$	0.991 5	44.648	1.487	699.32±17.89**
1%氮酮+1%薄荷醇	$Q=44.883 t+33.322$	0.994 7	44.883	1.495	714.71±21.96**

与对照组比较: ** $P < 0.01$, 下表同

** $P < 0.01$ vs control group, same as below

表6 不同促渗剂去氢木香内酯体外 $Q-t$ 模型拟合方程 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 6 Fitting equation of cumulative penetration models of dehydrocostus lactone with different penetration enhancers *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

促渗剂	拟合方程	R^2	渗透速率/ $(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
对照	$Q=31.150 t+40.104$	0.991 5	31.150	-	486.12±60.02
1%氮酮	$Q=32.084 t+32.067$	0.995 5	32.084	1.030	513.11±16.67
3%氮酮	$Q=30.050 t+28.663$	0.996 3	30.050	0.965	488.28±23.05
5%氮酮	$Q=28.261 t+32.589$	0.995 0	28.261	0.907	457.20±23.72
2%丙二醇	$Q=47.617 t+56.187$	0.986 9	47.617	1.529	762.78±29.80**
3%丙二醇	$Q=49.903 t+44.014$	0.990 1	49.903	1.602	814.78±29.36**
5%丙二醇	$Q=46.931 t+54.312$	0.991 4	46.931	1.507	746.90±42.48**
1%薄荷醇	$Q=49.766 t+42.542$	0.992 8	49.766	1.600	802.86±28.46**
3%薄荷醇	$Q=39.100 t+30.481$	0.994 1	39.100	1.255	624.85±20.97**
5%薄荷醇	$Q=33.003 t+35.010$	0.994 9	33.003	1.060	558.71±37.87**
1%氮酮+3%丙二醇	$Q=41.190 t+30.726$	0.995 4	41.190	1.322	648.40±27.66**
1%薄荷醇+3%丙二醇	$Q=47.907 t+40.376$	0.991 2	47.907	1.538	755.87±27.17**
1%氮酮+1%薄荷醇	$Q=48.900 t+32.311$	0.994 1	48.900	1.570	779.30±36.19**

体次数无显著性差异; 各给药组血清中 PGE_2 含量相较于模型组显著降低 ($P < 0.05$), 推测其镇痛作用可能与抑制体内促炎因子 PGE_2 的释放有关。

3 讨论

3.1 处方评价及优化

凝胶贴膏具有载药量大、皮肤相容性好、改善角质层水化作用等优势, 制备工艺简单, 但因药物不同会导致凝胶贴膏黏性和涂布性发生变化, 因此

没有成熟工艺供不同性质的药物使用。同时凝胶贴膏基质种类多, 理化性质不同, 加入顺序对成型性和涂布性也很关键。故通过查阅文献^[21-24], 从多种制备方法中优选出最佳工艺, 并通过单因素考察确定基质种类和用量范围。

常用优化方法包括正交设计、均匀设计、响应面法和 D-最优混料设计等。正交设计的实验次数较少, 忽略了各因素之间的交互作用, 而凝胶贴膏各

表7 不同促渗剂橙皮苷体外 $Q-t$ 模型拟合方程 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 7 Fitting equation of cumulative penetration models of hesperidin with different penetration enhancers *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

促渗剂	拟合方程	R^2	渗透速率/ $(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
对照	$Q=5.652 t+2.665$	0.996 0	5.652	-	103.71±38.51
1%氮酮	$Q=12.803 t+5.164$	0.993 2	12.803	2.265	233.19±18.68**
3%氮酮	$Q=10.822 t+4.954$	0.996 3	10.822	1.915	212.64±28.69**
5%氮酮	$Q=10.416 t+1.596$	0.998 9	10.416	1.843	217.87±40.74**
2%丙二醇	$Q=14.824 t+3.663$	0.994 7	14.824	2.623	256.19±22.65**
3%丙二醇	$Q=14.898 t+5.387$	0.990 9	14.898	2.636	263.45±32.06**
5%丙二醇	$Q=11.696 t+5.712$	0.995 1	11.696	2.069	240.26±25.19**
1%薄荷醇	$Q=12.663 t+0.536$	0.995 7	12.663	2.240	234.11±8.75**
3%薄荷醇	$Q=13.576 t+0.565$	0.993 8	13.576	2.402	248.81±18.19**
5%薄荷醇	$Q=12.016 t+4.010$	0.996 5	12.016	2.126	246.72±34.34**
1%氮酮+3%丙二醇	$Q=14.585 t+1.276$	0.993 5	14.585	2.581	255.70±35.69**
1%薄荷醇+3%丙二醇	$Q=13.800 t+6.358$	0.992 5	13.800	2.442	247.27±37.46**
1%氮酮+1%薄荷醇	$Q=17.744 t-0.056$	0.994 4	17.744	3.139	317.76±28.42**

表8 CZGP 对小鼠醋酸扭体的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effect of CZGP on acetic acid writhing in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	潜伏期/s	扭体次数/次	镇痛率/%	$\text{PGE}_2/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
模型	132±16 ^c	83±10 ^a	-	397.100±8.035 ^a
丁桂儿脐贴	242±37 ^b	55±17 ^b	37.20	211.400±5.187 ^c
XJT	385±162 ^a	40±10 ^c	54.19	262.200±8.742 ^b
CZGP	257±62 ^b	39±4 ^c	57.75	259.700±8.006 ^b

不同小写字母表示彼此之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)
different lowercase letters indicate significant differences between them ($P < 0.05$)

基质之间的作用,影响交联速度和膏体内聚力等;均匀设计法因实验次数大幅减少,准确性和预测性均较差;响应面法采用多元二次方程回归来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过模型拟合来寻找最优工艺或处方;D-最优混料设计固定各基质总量不变,预测结果准确性高,更适合凝胶贴膏的处方优化。因此本实验选择D-最优混料设计进一步优化凝胶贴膏处方。

3.2 体外透皮研究

CZGP 是由中药复方提取物制成,成分多样复杂,选择合理的质量指标至关重要。复方蜘蛛香中蜘蛛香为君药,消食健胃、理气止痛,木香为臣药,加强蜘蛛香理气止痛、消食之功效,草果既作佐药,又作使药,助君药、臣药理气止痛之功效,并制约其苦寒之性;且君药中橙皮苷含量与镇痛作用成正比相关^[25],臣药中木香烯内酯与去氢木香内酯为指标

性成分,因此选择木香烯内酯、去氢木香内酯和橙皮苷作为指标成分。

经皮渗透速率是凝胶贴膏的关键问题,渗透速率直接影响其药效,因此,选择合理有效的促渗剂非常重要。氮酮、丙二醇和薄荷醇是常用的促渗剂,本实验选取木香烯内酯、去氢木香内酯、橙皮苷 3 种主要成分,能够较全面的反映全方整体促渗效果。木香烯内酯和去氢木香内酯相对分子质量较小,脂溶性强,具有一定的透皮效果,透皮速率分别为 30.032、31.151 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$,当加入 3%丙二醇时促渗作用最强,增渗倍数分别为 1.523、1.602。橙皮苷相对分子质量较大,透皮速率为 5.652 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$,促渗作用较强的分别是 1%氮酮+1%薄荷醇和 3%丙二醇,综合 3 种成分选择 3%丙二醇作为促渗剂。

此外透皮接收液中 3 种成分的含量测定选择《中国药典》2020 年版中 2 种方法并进行调整。实验摸索同时测定透皮接收液中 3 种成分的方法过程中,选择不同波长进行测定,当在 215 nm 时能够同时检测到 3 种成分,但方法重复性不好,且因为波长太小导致基线无法平衡,故选择两种方法进行 3 种成分的含量测定。

3.3 初步药效学研究

本实验中丁桂儿脐贴、XJT、CZGP 的镇痛率分别为 37.20%、54.19%、57.75%,可见凝胶贴膏镇痛效果优于阳性药与 XJT。疼痛的发生发展与炎症反应有密切关系,当机体组织受到有害物质刺激形成损伤时,组织细胞释放炎症因子,通过细胞信号

传导通路导致 PGE₂ 等疼痛介质释放, 从而发动和传递痛觉信号^[26], 各给药组血清中 PGE₂ 水平均显著少于模型组, 推测其镇痛作用可能与抑制体内 PGE₂ 的释放有关。CZGP 与 XJT 在幼鼠均表现出较好的镇痛作用, 可见剂型改造表现出一定的成效, 关于 CZGP 与 XJT 的其他作用还需进一步研究。

志谢: LOGAN 公司提供 DHC-6TL 型干加热透皮系统。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Sah S P, Mathela C S, Chopra K. Elucidation of possible mechanism of analgesic action of *Valeriana wallichii* DC chemotype (patchouli alcohol) in experimental animal models [J]. *Indian J Exp Biol*, 2010, 48(3): 289-293.

[2] Li Y S, Zhang J, Tian G H, et al. Kirenol, darutoside and hesperidin contribute to the anti-inflammatory and analgesic activities of *Siegesbeckia pubescens* Makino by inhibiting COX-2 expression and inflammatory cell infiltration [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113547.

[3] Wang Y, Shi D Q, Jiang N, et al. A new acylated iridoid and other chemical constituents from *Valeriana jatamansi* and their biological activities [J]. *Nat Prod Res*, 2021, doi: 10.1080/14786419.2021.1961255.

[4] Zhang B, Wang Y, Jiang C M, et al. *Valeriana jatamansi* Jones inhibits Rotavirus-induced diarrhea via phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(8): 1115-1122.

[5] Jo H G, Lee G Y, Baek C Y, et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Aucklandia lappa* root extracts on acetic acid-induced writhing in mice and monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. *Plants*, 2020, 10(1): E42.

[6] Zheng H, Chen Y L, Zhang J Z, et al. Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 250: 68-77.

[7] Lv Q, Xing Y, Dong D, et al. Costunolide ameliorates colitis via specific inhibition of HIF1 α /glycolysis-mediated Th17 differentiation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107688.

[8] Xie F, Zhang H, Zheng C, et al. Costunolide improved dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis in mice through NF- κ B, STAT1/3, and Akt signaling

pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106567.

[9] Lee K Y, Kim S H, Sung S H, et al. Inhibitory constituents of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia isolated from *Amomum tsao-ko* [J]. *Planta Med*, 2008, 74(8): 867-869.

[10] 杨小方. 草果挥发油提取工艺及药理作用的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.

[11] 李真真, 万玲娟, 王继龙, 等. 温度与时间对祖师麻后交联凝胶贴膏流变学特性影响研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(13): 3457-3464.

[12] 朱敏丰, 朱瑶, 朱洁, 等. 中药凝胶贴膏的临床应用研究概况 [J]. *海峡药学*, 2021, 33(2): 113-116.

[13] 梅佳华, 崔利利, 郝佳旭, 等. 基于质量源于设计理念的复方蜘蛛香醇提工艺研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(8): 774-780.

[14] 张莹莹, 刘伟, 周文杰, 等. 少腹逐瘀凝胶贴膏剂基质处方优化及体外透皮特性研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4284-4292.

[15] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 143-144.

[16] 许润春, 贺亚男, 裴瑾, 等. 川乌-花椒挥发油凝胶贴膏的成型工艺及配伍增效机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(6): 1517-1529.

[17] 黄洋洋, 郑昊圳, 王圣鑫, 等. 复方活血凝胶贴膏剂基质处方及制备工艺的研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(2): 241-245.

[18] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 63-64, 199-200.

[19] 张卫华, 胡杰, 吴珍珍, 等. 不同促渗剂对马钱子碱囊泡凝胶体外渗透性能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(7): 14-16.

[20] 曾令军, 庄珊珊, 黄爱文, 等. 不同促渗剂对盐酸氨酮戊酸原凝胶体外透皮吸收的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(12): 1167-1170.

[21] 肖宇硕. 复方吴茱萸水凝胶贴剂的制备工艺及质量标准研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.

[22] 章焯雯. 小儿退热凝胶贴膏的制备工艺与评价研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[23] 万玲娟, 周广芬, 王继龙, 等. 载药量对后交联祖师麻凝胶贴膏剂流变学及体外经皮渗透特性的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(19): 5873-5878.

[24] 李艳. 痛风清凝胶贴膏的研制及其体外经皮渗透研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.

[25] 张顺然. 不同产地蜘蛛香镇痛组分对比研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.

[26] 吴丽, 王丽丽, 费文婷, 等. 芍药苷和芍药内酯苷对小鼠疼痛模型的镇痛作用及对 β -EP、PGE₂ 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(3): 915-918.

[责任编辑 郑礼胜]