

文章编号: 1004-4353(2018)03-0250-06

“循环通络”乳膏剂制备及其抗类风湿性关节炎的考察

尤钺¹, 许灵善², 郭建鹏^{1,3*}

(1. 延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002; 2. 龙井工业集中区管理委员会, 吉林 龙井 133400;
3. 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室(延边大学), 吉林 延吉 133002)

摘要: 以综合评分为指标,通过正交设计试验优选“循环通络”乳膏剂处方,并采用单因素试验对其制备工艺参数进行了优化.研究表明,乳膏剂的最佳处方为浓缩药液 200 g、凡士林 90 g、羊毛脂 10 g、液体石蜡 80 g、单硬脂酸甘油酯 50 g、硬脂酸 65 g、丙三醇 150 g、吐温 80 40 g、月桂氮草酮 10 g、尼泊金乙酯 0.5 g,用水加至 1000 g.制备的最佳工艺为油、水相分别加入乳化,搅拌速度为 $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,乳化温度为 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,乳化时间为 15 min.抗类风湿性关节炎实验结果表明,该乳膏能够改善大鼠的关节肿胀,降低大鼠血清中炎症因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6)的含量和增加抗炎细胞因子 IL-10 的含量.

关键词: 类风湿性关节炎; 朝药复方; 正交设计; 综合评分

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

Preparation process and anti-rheumatoid arthritis investigation of XUN HUAN TONG LUO ointments

YOU Yue¹, XU Lingshan², GUO Jianpeng^{1,3*}

(1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China; 2. Longjing Industrial Concentration District Management Committee, Longjing 133400, China; 3. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Function Molecules (Yanbian University), Ministry of Education, Yanji 133002, China)

Abstract: Based on the comprehensive score as the index, the orthogonal design experiment was used to select the prescription of XUN HUAN TONG LUO ointments, and the single factor experimental method was used to optimize the process parameters. The optimum prescription of ointments is finally obtained as a concentrated liquid 200 g, petrolatum 90 g, lanolin 10 g, liquid paraffin 80 g, glyceryl monostearate 50 g, stearic acid 65 g, glycerol 150 g, Tween-80 40 g, laurocapram 10 g, ethylparaben 0.5 g, and add water to 1000 g. The optimum process implied that emulsification is attributed to add two phases of oil and water respectively, the stirring speed of $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, the emulsification temperature of $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the emulsification time of 15 min. Anti-rheumatoid arthritis experiments showed that the ointments can improve joint swelling in rats, reduce the levels of inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β and IL-6) in the serum of rats, increase the content of anti-inflammatory factor (IL-10).

Keywords: rheumatoid arthritis; Korean medicine compound; orthogonal design; comprehensive score

“循环通络筋骨止痛酊”是在朝医理论指导下,以朝鲜族祖传秘方为基础开发出来的具有省级保健用品批号(吉卫健用字[2014]第 001 号)的产品.本品处方主要包含黄芩、黄芪、细辛、当归、防风等药味,具有活血化瘀、止痛、改善微循环的功效,适用于由痹证引起的疼痛、肿胀、僵直拘挛,即适用于类风湿性

关节炎(Rheumatoid arthritis)的辅助医疗.由于“循环通路筋骨止痛酊”存在携带、运输不便,患者顺应性差,制剂稳定性差等缺点,因此本文在保证其临床疗效的前提下,通过优选制剂处方和工艺参数,将原剂型改为乳膏剂,以增加制剂的稳定性和患者顺应性,并通过动物实验验证本文方法的有效性.

1 材料与仪器

1.1 药材与试剂

“循环通路”酊剂药液,延边山宝杜家源风湿骨病研究所提供,批号:20161210.

丙三醇、硬脂酸、硬脂醇、单硬脂酸甘油酯、液体石蜡、吐温 80、三乙醇胺、十八醇、十二烷基硫酸钠为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司生产;凡士林、羊毛脂、尼泊金乙酯为分析纯,沈阳市华东试剂厂生产;蜂蜡为化学纯,北京索莱宝科技有限公司生产;月桂氮草酮、司盘 80 为化学纯,国药集团化学试剂有限公司生产;冰乙酸、二甲苯为化学纯,成都化学试剂厂生产;伊文斯兰,Sigma 公司生产;肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素- 1β 、IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒,联科生物技术股份有限公司生产.

1.2 仪器

主要仪器有:紫外分光光度计(D-1900,日本日立公司);电子天平(FA2004,上海良平仪器仪表有限公司);低温超速离心机(美国 Thermo 公司);超低温冰箱(美国 NBS 公司);高剪切分散乳化机(DE-100LB,上海弗鲁克流体机械制造有限公司);Nikon FX-35A 光学显微镜(日本 Nikon 公司);YLS-Q4-打耳器(济南益延科技发展有限公司);YLS-7B-大鼠足跖容积测定仪(济南益延科技发展有限公司);SYNERGY HTX 多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司).

1.3 实验动物

昆明种小鼠(18~22 g)和 Wistar 雄性大鼠(160~200 g)由延边大学实验动物中心提供(实验动物生产许可:SCXK(吉)2011-0007).

2 处方研究

2.1 处方预试验

制备 O/W 型乳膏剂;“循环通路”主药液浓缩至相对密度为 1.15 (22 $^{\circ}\text{C}$)的浓缩药液;基质与浓缩药液配比范围为 5 : 1~4 : 1(体积比);尼泊金乙酯的用量范围为 0.05%~0.1%;月桂氮草酮的用量范围为 1.0%~3.0%^[1].

2.2 基质组分的确定

根据文献[2-4]和预试验,以 4 组较为常用的 O/W 型乳膏剂的基质组成作为备选基质处方,见表 1.按表 1 制备 4 组乳膏剂,以综合评分筛选最优备选处方.

表 1 乳膏基质组成及配比 g

处 方 编 号	成分															
	浓 缩 药 液	硬 脂 酸	硬 脂 醇	单 硬 脂 酸 甘 油 酯	蜂 蜡	液 体 石 蜡	凡 士 林	羊 毛 脂	三 乙 醇 胺	吐 温 80	司 盘 80	十二 烷 基 硫 酸 钠	丙 三 醇	月 桂 氮 草 酮	尼 泊 金 乙 酯	加 水 至
A	200	130	10	—	—	150	85	10	30	—	—	—	120	10	0.5	1 000
B	200	—	250	20	—	—	200	15	—	—	—	10	50	10	0.5	1 000
C	200	150	—	35	50	50	—	—	—	50	5	—	80	10	0.5	1 000
D	200	65	—	50	—	90	90	10	—	40	—	—	150	10	0.5	1 000

2.2.1 乳膏剂制备方法 取主药液浓缩至相对密度为 1.15 (22 ℃),按表 1 分别称量油相成分、水相成分放置于不同容器中,油相加热至 70~75 ℃,水相加热至 80 ℃;将浓缩药液与丙三醇研磨成糊状物,混合均匀后再与水相混合;各相混匀后将水相缓慢加入至油相中(70 ℃),以转速 250 r·min⁻¹ 搅拌;乳化 20 min 后停止加热,继续搅拌冷却至室温,即得乳膏剂样品。

2.2.2 最优备选处方的确定 以乳膏剂质量的综合评分评价各组备选处方^[5-7],综合评分采用的考察指标及 A、B、C、D 4 组处方的评分标准如图 1 所示. 其中粒径评分=10-(该组平均粒径/60),粒度分布评分=10-该组跨距值×10,保湿性评分=20-失水率×20. 叠加分数各项指标分数即为考察总分,评分越高说明质量越佳. 经计算,各处方的得分: A 为 73.39 分, B 为 66.31 分, C 为 65.49 分, D 为 77.52 分.

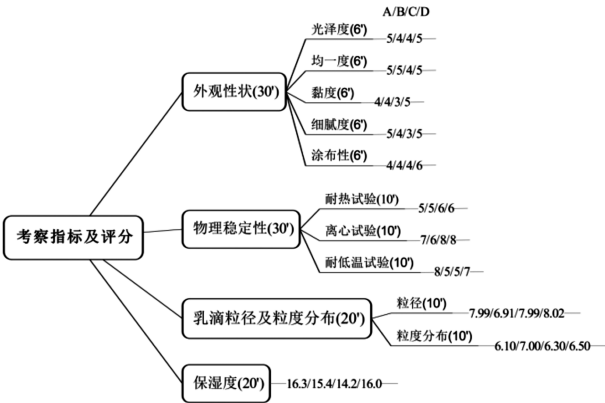


图 1 综合评分指标及评分标准

2.3 处方优化

2.3.1 正交设计实验 以处方 D 的基质组成为基础,结合文献[8],将吐温 80(A)、液体石蜡(B)、单硬脂酸甘油酯(C)的处方用量作为影响因素,各取 3 个水平,各因素水平见表 2. 考察指标及评分标准同 2.2.2 进行,选用 L₉ (3³) 正交表进行试验,实验安排及结果见表 3.

表 2 正交设计实验因素水平表

水平	因素		
	A/g	B/g	C/g
1	40	90	45
2	35	80	50
3	45	100	60

表 3 实验安排及结果

试验号	因素			结果				综合评分
	A	B	C	外观形状	物理稳定性	乳滴粒度	保湿性	
1	3	3	1	28	27	18	18.1	91.1
2	1	2	3	20	21	14	15.2	70.2
3	3	1	3	23	22	15	16.6	76.6
4	1	3	2	20	20	14	15.5	69.5
5	2	3	3	20	20	14	14.8	68.8
6	3	2	2	21	21	14	15.1	71.1
7	2	2	1	27	26	18	17.6	86.6
8	2	1	2	21	21	16	15.2	73.8
9	1	1	1	26	25	17	16.2	84.2

2.3.2 正交设计的结果分析 以各实验组的综合评分值为指标进行方差分析,结果见表 4. 由表 4 可以看出,吐温 80 与液体石蜡的用量对实验结果无显著性影响,单硬脂酸甘油酯的用量对乳膏的综合评分有显著性影响. 进行多水平均值检验显示, A 因素对结果的影响为 A₃>A₂>A₁, A₃与 A₁间无显著性差异,经综合考虑本文选择 A₁; B 因素对结果的影响为 B₁>B₃>B₂, B₁与 B₂间无显著性差异,经综合考虑本文选择 B₂; C 因素对结果的影响为 C₂>C₁>C₃, 故本文选择 C₂. 综上, 3 种辅料的优选水平为

$A_1B_2C_2$, 即吐温 80 40 g、液体石蜡 80 g、单硬脂酸甘油酯 50 g.

表 4 正交试验方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	<i>F</i>	<i>P</i>
I	38.029	2	19.01	1.705	0.370
II	8.242	2	4.121	0.370	0.730
III	489.042	2	244.521	21.928	0.044
误差	22.302	2	11.151	—	—

3 制备工艺研究

分别对不同搅拌速度 V (150,250,350,450 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)、乳化温度 T (60,70,80,90 $^{\circ}\text{C}$)、乳化时间 t (5,10,15,20 min)和不同乳化剂加入方式(水中加入法,油中加入法,油、水分别加入法^[9]) 4 个影响因素进行单因素考察.按 2.2.1 中的方法制备乳膏剂,按 2.2.2 中的评分标准进行综合评分,结果见表 5.由表 5 可以看出,当 V 为 250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 T 为 70 $^{\circ}\text{C}$ 、 t 为 15 min 时,使用油、水分别加入法制备的乳膏剂的综合评分最高.

表 5 工艺参数综合评分结果

$V/(\text{r} \cdot \text{min}^{-1})$	$T/^{\circ}\text{C}$	t/min	乳化方法	综合评分
150	70	20	转相法	80.6
250	70	20	转相法	92.5
350	70	20	转相法	88.1
450	70	20	转相法	86.7
250	60	20	转相法	80.2
250	80	20	转相法	91.9
250	90	20	转相法	82.2
250	70	5	转相法	86.0
250	70	10	转相法	92.5
250	70	15	转相法	92.9
250	70	10	水中加入法	86.8
250	70	10	油中加入法	90.2
250	70	10	油、水分别法	93.6

按最佳制备工艺制备 3 批次乳膏,按 2.2.2 中的方法对其质量进行考察,综合评分结果分别为 93.2 分、93.1 分、93.4 分, $RSD<2\%$,该结果说明优选的制备工艺稳定可行.

4 抗类风湿性关节炎的研究

4.1 供试样品

“循环通路”乳膏剂由延边医药健康产业中试基地按照 2.2.1 中的方法制备(批号:20161125).

4.2 动物模型

模型采用佐剂性关节炎(Adjuvant Arthritis,AA)大鼠模型^[10].

4.2.1 AA 诱导剂的制备 将卡介苗冻干粉(BCG)及液体石蜡进行灭活处理,在超净台中用无菌注射器抽取 10 mL 液体石蜡倒入研钵中,稍稍研磨滋润研钵壁后倒入 100 mg BCG,顺时针方向研磨至乳化,即得浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的完全弗式佐剂 CFA^[11].

4.2.2 AA 模型的建立 酒精擦拭大鼠右后足趾部位(消毒)后,肉垫处皮内注射 0.1 mL CFA.空白对照组大鼠用同样方式注射 0.9%氯化钠注射液 0.1 mL.第 7 d 同法再注射 1 次 CFA,加强诱导.第 14 d 筛选出左侧足趾明显肿胀的大鼠,该大鼠即为 AA 大鼠模型^[12].

4.3 分组与给药

取造模成功的 32 只大鼠,随机分为模型对照组和低、中、高剂量给药组.大鼠背部脱毛后涂抹给药,2 次/d,连续 20 d.空白对照组和模型对照组给予相同的剂量.

4.4 检测指标与结果

4.4.1 体重变化 注射造模剂当天记 0 d,定期称重,记录并观察大鼠体重变化规律.增重率的计算公式为:增重率/%=(第 n 天体重-第 1 天体重)/第 1 天体重 $\times 100$.计算所得的增重率如图 2 所示.由图 2 可以看出,模型对照组和给药组均与空白对照组呈极显著差异($P<0.01$);中、高剂量组与模型对照组呈显著统计学差异($P<0.05$),低剂量组与对照组无显著差异($P>0.05$),但低剂量组的体重有所增加.

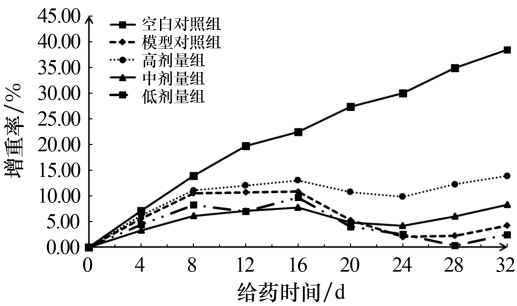


图 2 大鼠体重增重率

4.4.2 四肢关节炎评分情况 根据大鼠关节红肿程度和范围,采用关节炎 5 级评分法对 AA 模型大鼠关节炎进展程度进行定期评分.具体评分标准如下:0 分为正常;1 分为足爪及足垫单个区域出现轻度肿胀;2 分为足爪和足垫或踝关节 2 个以上区域出现红斑和轻微肿胀;3 分为踝关节到跖关节或掌关节出现红斑和中度肿胀;4 分为踝关节僵硬、畸形、功能障碍和重度肿胀.关节炎表现最高为 4 分,总和累计最高为 16 分^[12].由表 6 评分结果可以看出,高、中剂量组与模型对照组相比呈极显著性差异($P<0.01$),而低剂量组与模型对照组相比呈不显著差异.以上结果表明,“循环通络”乳膏对大鼠的关节炎症有改善作用.

表 6 乳膏剂对关节炎评分的影响 $\bar{x} \pm SD, n=8$

组别	关节炎评分							
	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d	28 d	32 d
模型对照组	0	2.22±0.12	8.45±0.79	10.01±0.89	10.23±0.76	9.38±0.87	9.42±0.97	9.22±1.03
高剂量组	0	1.77±0.11	8.12±0.56	7.98±0.67 ^{##}	7.12±0.66 ^{##}	6.8±0.54 ^{##}	6.65±0.56 ^{##}	6.50±0.45 ^{##}
中剂量组	0	1.86±0.11	7.88±0.81	8.67±0.72 ^{##}	7.99±0.78 ^{##}	7.84±0.64 ^{##}	7.12±0.65 ^{##}	6.83±0.65 ^{##}
低剂量组	0	2.08±0.13	8.20±0.80	9.09±0.82	8.92±0.88	8.56±0.92 [#]	7.98±0.87 ^{##}	7.78±0.86 ^{##}

注:与模型对照组比较, # 表示 $P<0.05$, ## 表示 $P<0.01$

4.4.3 继发侧足爪肿胀度 致炎前用足爪测试仪测量每只大鼠右后足掌的体积(测到踝关节以下部位,并作标记),定期测定、记录,并计算继发侧足爪肿胀率,结果如表 7 所示.表 7 显示,低剂量组在给药初期,大鼠的足爪肿胀无明显改善,但在后期改善明显.给药 20 d 时,高剂量组与模型对照组相比呈极显著性差异($P<0.01$).这表明本品能明显抑制大鼠的关节局部早期炎症,改善其关节肿胀.

表 7 乳膏剂对大鼠足爪肿胀程度的影响 $\bar{x} \pm SD, n=8$

组别	不同给药时间大鼠右足的体积								
	1 d	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d	28 d	32 d
空白对照组	1.58±0.28	1.58±0.23	1.58±0.27	1.60±0.29	1.62±0.26	1.64±0.26	1.66±0.27	1.68±0.28	1.70±0.28
模型对照组	1.58±0.25	1.59±0.24	1.62±0.39	1.97±0.31 ^{**}	2.32±0.32 ^{**}	2.65±0.42 ^{**}	2.98±0.44 ^{**}	2.86±0.32 ^{**}	2.79±0.33 ^{**}
高剂量组	1.57±0.25	1.59±0.25	1.62±0.26	1.92±0.35	2.22±0.21 ^{##}	2.57±0.21 ^{##}	2.45±0.34 ^{##}	2.41±0.26 ^{##}	2.36±0.24 ^{##}
中剂量组	1.57±0.20	1.60±0.24	1.63±0.38	1.96±0.32	2.23±0.27 [#]	2.59±0.25 ^{##}	2.68±0.21 ^{##}	2.53±0.31 ^{##}	2.49±0.26 ^{##}
低剂量组	1.54±0.28	1.59±0.25	1.63±0.36	1.95±0.36	2.31±0.39	2.60±0.38	2.83±0.43 [#]	2.64±0.36 [#]	2.59±0.31 [#]

注:与空白对照组比较, ** 表示 $P<0.01$;与模型对照组比较, # 表示 $P<0.05$, ## 表示 $P<0.01$

4.4.4 大鼠血清中的细胞因子含量 于末次给药 2 h 后,对大鼠心脏穿刺取全血,置低温离心机中高

速离心 20 min,吸取上层血清,分装保存于一 80 ℃ 冰箱中备用.按照 ELISA 试剂盒说明书中的方法分别测定 TNF- α ,IL-1 β ,IL-6,IL-10^[13],结果见表 8.表 8 显示,在空白对照组中,细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10)的表达处于正常水平;模型对照组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的炎症因子水平均有显著升高,且高于其余各组,但抗炎因子 IL-10 水平均显著低于其他各组.与模型对照组相比,高剂量组可显著降低 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,升高抗炎因子 IL-10 水平;低剂量组可显著降低 TNF- α 水平,升高 IL-10 水平;中剂量组可显著降低 TNF- α 、IL-1 β 水平,升高 IL-10 水平.这表明乳膏剂对炎症因子和抗炎因子的表达具有显著影响,且呈现量效关系.

表 8 乳膏剂对大鼠血清细胞因子的影响 $\bar{x} \pm SD, n=8$

组别	TNF- α /(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
空白对照组	24.67 \pm 2.53	18.21 \pm 0.52	40.33 \pm 1.25	1 200.28 \pm 15.34
模型对照组	190.67 \pm 2.12**	53.67 \pm 1.11**	160.85 \pm 1.74**	264.89 \pm 18.37**
高剂量组	68.78 \pm 3.33##	26.78 \pm 1.28##	120.56 \pm 2.23##	978.45 \pm 16.24##
中剂量组	87.67 \pm 5.62##	34.54 \pm 1.44##	154.82 \pm 4.15	805.13 \pm 23.98##
低剂量组	160.78 \pm 6.23	48.78 \pm 2.15	156.54 \pm 7.14	804.56 \pm 59.34##

注:与空白对照组比较,**表示 $P<0.01$;与模型对照组比较,##表示 $P<0.01$

5 结论

本文以乳膏物理稳定性、乳滴粒径及粒度分布、保湿性为客观指标,以乳膏的外观性状为主观指标,制备了“循环通路”乳膏剂.研究表明,制剂的最佳处方为浓缩药液 200 g、凡士林 90 g、羊毛脂 10 g、液体石蜡 80 g、单硬脂酸甘油酯 50 g、硬脂酸 65 g、甘油 150 g、吐温 80 40 g、月桂氮草酮 10 g、尼泊金乙酯 0.5 g,用水加至 1 000 g.制备的最佳工艺为油、水相分别加入乳化,搅拌速度为 250 r \cdot min⁻¹,乳化温度为 70 ℃,乳化时间为 15 min.抗类风湿性关节炎实验结果表明,本品对 AA 模型大鼠的关节炎外观症状有改善作用,对炎症因子和抗炎因子表达具有显著影响,且呈现量效关系.综上表明,本文制备的“循环通路”乳膏剂可以作为“循环通路筋骨止痛酊”的改剂型产品用于临床.

参考文献:

[1] 孙媛,赵媛,刘波.皮肤维护乳膏剂的制备及质量研究[J].中国医院用药评价与分析,2016,16(1):59-60.

[2] Iizhar Syed Ahmed, Syed Ismail Ahmed, Satar Rukhsana, et al. In vitro assessment of pharmaceutical potential of ethosomes entrapped with terbinafine hydrochloride[J]. Journal of Advanced Research, 2016,7(3):453-461.

[3] 王磊,程岚,杨跃辉.正交试验优选五倍子软膏处方[J].实用药物与临床,2013,16(4):318-320.

[4] 余健华,千永香.正交设计优选复方曲安奈德乳膏剂的制备工艺[J].中国医药指南,2009,7(9):37-38.

[5] 仇有禄.复方盐酸布替萘芬乳膏剂的制备与临床应用[J].中国医院药学杂志,2013,33(19):1644-1646.

[6] 梁晓阳,庄忠宝,张晓云,等.O/W 型山金车软膏剂的制备及体外评价[J].应用化工,2016,45(7):1395-1399.

[7] 陆彬.药物新剂型与新技术[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2005:257-264.

[8] 赵晓军,赵文明.吡哆美辛乳膏的制备及体外释放度考察[J].中国现代应用药学,2014,31(11):1362-1366.

[9] Grove G, Zerweck C. An evaluation of the moisturizing and anti-itch effects of a lactic acid and pramoxine hydrochloride cream[J]. Cutis, 2004,73(2):135-139.

[10] 马玉琛,段斐,孟明,等.改良弗氏完全佐剂制备大鼠类风湿性关节炎模型[J].现代预防医学,2008,35(10):1989-1991.

[11] 蔡文虹,孙保东,张宝凤,等.类风湿性关节炎动物模型研究进展[J].中国当代医药,2012,19(4):10-12.

[12] 李培培,解国雄,宋珊珊,等.大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J].中国免疫学杂志,2012,28(5):453-457.

[13] Barış S, Akyürek Ö, Dursun A, et al. The impact of the IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-6 and IL-10 gene polymorphisms on the development of Behcet’s disease and their association with the phenotype[J]. Medicina Clinica, 2016,146(9):379-383.