

· 中药工业 ·

基于“药辅合一”制备艾天羊肌肉关节通络膏Ⅱ 并评价药效

许蕊蕊¹, 陈金素^{2a}, 李越¹, 邱仁杰¹, 王秀丽^{1*}, 邹博林¹, 陈培³

1. 北京中医药大学, 北京 102488;

2. 云南省中医医院, 云南 昆明 650021;

3. 艾天羊生物科技有限公司, 四川 绵阳 622659

[摘要] 目的: 发挥“药辅合一”的优势, 将艾天羊肌肉关节通络膏(ATY乳膏)油相的中链脂肪酸更换为薄荷油, 优化处方工艺, 得到ATY乳膏Ⅱ, 并对2种通络膏进行药效学比较研究。方法: 以油/水相质量比、促透剂、添加剂量和药液与基质质量比为考察因素, 采用Box-Behnken响应面法优化ATY乳膏Ⅱ制备工艺。通过热板实验, 研究比较2种通络膏对小鼠痛阈值的影响; 通过小鼠耳肿胀实验, 研究比较2种通络膏抗炎的作用; 通过醋酸扭体实验, 观察2种通络膏对化学刺激引起的疼痛的影响。结果: ATY乳膏Ⅱ的优化工艺处方为油/水相质量比35:65, 促透剂添加剂量8%, 药液与基质质量比1:10。药效实验中, 改进后的ATY乳膏Ⅱ组与模型组比较, 可显著提高小鼠痛阈值($P<0.01$), 抑制二甲苯致小鼠耳肿胀的程度($P<0.01$), 对化学刺激引起的疼痛具有一定的镇痛作用($P<0.01$); 且上述作用ATY乳膏Ⅱ优于ATY乳膏。结论: 改进后的ATY乳膏Ⅱ的工艺简单、可行, 稳定性良好, 且具有活血化瘀、抗炎镇痛作用。

[关键词] 乳膏; 药辅合一; Box-Behnken响应面法; 抗炎镇痛

[中图分类号] R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)10-1803-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191118002

Preparation of Aitianyang Muscle and Joint Collaterals-dredging Cream II with Medicinal Excipient

XU Rui-rui¹, CHEN Jin-su^{2a}, LI Yue¹, QIU Ren-jie¹, WANG Xiu-li^{1*}, ZOU Bo-lin¹, CHEN Pei³

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China;

3. Aitianyang Biological Technology Co., Ltd., Mianyang 622659, China

[Abstract] **Objective:** Following the principle of unifying medicine with excipient, this paper aims to replace the medium-chain fatty acids in the oil phase of Aitianyang muscle and joint collaterals-dredging Cream (hereinafter referred to as ATY Cream) with peppermint oil, optimize the prescription process to yield ATY Cream II, and compare the effects of ATY Cream and ATY Cream II. **Methods:** Box-Behnken design was employed to optimize the oil-water phase mass ratio, the amount of penetration enhancer, and medicinal extract for the preparation of ATY Cream II. The hot-plate test was used to investigate the effect of the two creams on the pain threshold of mice, mouse ear swelling test the anti-inflammatory effect, and acetic acid-induced writhing test the effect on chemical stimulus-induced pain. **Results:** The optimized preparation process for ATY Cream II is as follows: oil-water phase mass ratio of 35:65, 8% penetration enhancer, and medicinal extract-matrix mass ratio of 1:10. The two creams can significantly increase the pain threshold of mice ($P<0.01$), alleviate xylene-induced ear swelling ($P<0.01$), and relieve the pain induced by chemical stimulus ($P<0.01$) compared with the model group, particularly the ATY Cream II. **Conclusion:** The improved ATY Cream II, featuring simple preparation and high stability, has blood-activating and stasis-resolving, anti-inflammatory, and analgesic effects.

[Keywords] cream; unification of medicine and excipient; Box-Behnken response surface method; anti-inflammatory and analgesic effects

* [通信作者] 王秀丽, 副研究员, 研究方向: 新型给药系统; E-mail: Lnwangxiuli@163.com

^a 并列第一作者

中药复方制剂因为成分极其复杂,往往需要添加大量的辅料以促进成型。辅料在制剂中发挥重要作用,如成型、促进主药发挥药效等。然而,高比例辅料不仅增加患者服药量及心理和经济负担,降低患者顺应性,也增加了不良反应的可能性,消耗更多的资源。如果制剂中能应用既发挥药效、与主药协同作用,又能发挥辅料的促进成型等功能材料,则一举两得。“药辅合一”的理念便源于此。

艾天羊肌肉关节通络方系由乳香、没药等10余种中药组成的经验方,具有活血化瘀、消炎止痛等功效。鉴于其原本应用形式为药物细粉与凡士林混合,制得按摩膏,不利于药物成分溶出、患者顺应性差等问题,本课题组通过95%乙醇提取原料药后,将提取浓缩液制备得到以中链脂肪酸为油相的普通乳膏——艾天羊肌肉通络膏(ATY乳膏),实现了改善有效成分溶出和提高患者顺应性的目标。本研究在ATY乳膏基础上,运用“药辅合一”的理念,将ATY乳膏油相的中链脂肪酸用薄荷油替代,得到ATY乳膏Ⅱ,其中薄荷油既发挥承载药物、构成乳膏、促进主药透皮的辅料作用,又可以很好地发挥止痛、疏散风热等治疗作用,有助于促进艾天羊肌肉关节通络方的抗炎、镇痛作用。

1 材料

1.1 试药

乳香、没药等中药饮片购于广州市岭南中药饮片有限公司佛山分公司,符合《中华人民共和国药典》2015年版相关项下的要求。

硬脂酸(批号:CG10070082,上海麦克林生化科技有限公司);单硬脂酸甘油酯(批号:C10286479,北京华威锐科化工有限公司);薄荷油(安徽酷尔生物工程有限公司);十二烷基硫酸钠(批号:1202021,广东省精细化学品工程技术研究中心);尼泊金乙酯、冰醋酸(天津市福晨化学试剂厂);二甲苯、丙三醇(批号分别为20160805、20161005,北京化学试剂公司);消伤痛搽剂(安阳中智药业有限责任公司);无水乙醇(分析纯,北京化工厂);去离子水(实验室自制)。

1.2 仪器

DFT-100A型手提式高速万能粉碎机(温岭市林

大机械有限公司);CP225D型十万分之一电子分析天平(Sartorius公司);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DB-3型热板仪(常州普天仪器制造有限公司);101-1AB电热风干燥箱(天津赛得利斯实验仪器制造厂)。

1.3 动物

SPF级KM小鼠,体质量18~22g;SD大鼠,体质量180~220g,合格证号:SCXK(京)2016-0002,购于北京斯贝福实验动物科技有限公司,饲养于北京中医药大学动物房。

2 方法与结果

2.1 药液的提取

称取处方量乳香、没药等中药饮片,打成细粉过80目筛,置2000mL具塞锥形瓶中,摇匀。加入95%乙醇1000mL振荡,使得乙醇浸润所有粉末,避光保存。72h后,减压抽滤,避光保存滤液,滤渣继续用1000mL95%乙醇避光浸提;24h后,减压抽滤,避光保存滤液,滤渣继续用1000mL95%乙醇避光浸提;24h后,减压抽滤,合并3次的滤液,回收乙醇至药液质量浓度约为 $0.82\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,即得提取液。

2.2 Box-Behnken响应面法优选乳膏基质处方

2.2.1 实验设计 预试验发现,油/水相质量比、促透剂的添加剂量及药液的用量,均对ATY乳膏Ⅱ的质量产生影响。因此,在预实验基础上,以油/水相质量比(A)、促透剂的添加剂量(B)和药液与基质质量比(C)设为自变量,以综合评分(Y)为评价指标,每个因素选取低、中、高3个水平,因素水平见表1。

表1 ATY乳膏Ⅱ基质处方设计因素与水平

水平	因素		
	A	B/%	C
-1	30:70	6	1:8
0	35:65	8	1:10
1	40:60	10	1:12

2.2.2 考察指标及评价方法 在筛选处方过程中,以外观均一性、涂抹延展性、离心稳定性、耐寒性和耐热性作为乳膏质量评价的指标,各项考察指标的评价方法^[1-2]:1)外观均一性。取适量样品,观察

外观质地是否均匀、颜色是否一致、静置是否会自然分层。2) 涂布延展性。取适量样品, 在表面皿上涂布, 观察涂布过程中有无结块、是否会产生颗粒。3) 离心稳定性评价。取适量乳膏于2 mL的EP管中, 4000 r·min⁻¹离心15 min (离心半径为5 cm), 观察是否发生分层、变色等油水分离现象。4) 耐寒性。取适量乳膏于2 mL的离心管中置-20℃放置24 h, 取出放至室温, 观察实验样品是否发生分层、变色等油水分离现象。5) 耐热性。取适量乳膏于2 mL的EP管中, 密封, 于50℃恒温箱中, 恒温保持6 h, 观察上述实验样品是否发生分层、变色等油水分离现象(表2), 评分情况见表3。

$$\begin{aligned} \text{综合评分} = & \text{外观得分} + \text{延展性实验得分} + \\ & \text{离心稳定性实验得分} + \text{耐寒实验得分} + \\ & \text{耐热实验得分} \end{aligned} \quad (1)$$

2.2.3 模型拟合 采用Design-Expert对上面数据进行分析, 以Y对自变量进行模型拟合, 并通过r等对拟合模型进行评价, 通过比较各拟合方程的拟合度, 得到二次多项式回归方程 $Y=93.28 - 1.13A - 5.81B + 0.63C + 0.37AB + 2.25AC - 0.37BC - 8.37A^2 - 10.97B^2 - 5.87C^2$, $r=0.9931$, $P<0.0001$, $F=111.57$, 表明模型差异有统计学意义; 失拟项 $P=0.3099>0.05$, 失拟项差异无统计学意义, 说明该模型拟合度和可信度均有效, 实验误差小, 可以用此模型对薄荷油处方进行分析和预测, 结果见表4。

2.2.4 响应面优化分析 根据拟合方程, 通过Design-Expert V8.0.6.1软件绘制评价指标随因素变化的等高线图和响应面图, 见图1~3。

由图1~3可知, 油/水相质量比、促透剂添加剂量和药液的用量对综合评分影响均成抛物线形, 即随着因素的增大, 综合评分呈先增大后降低的趋势, 因此, 在提取工艺中适当提高三者比例可以提高综合评分。由表4可知, 促透剂添加剂量对综合评分的影响不如其他2个因素显著, 随着其添加比例的提高综合评分先升高, 继而缓慢降低, 因

此, 在实际应用中应控制促透剂的添加剂量在最佳范围。

根据回归模型分析且考虑实际操作的可行性, 各因素值保留为整数, ATY乳膏II最优处方: 油/水相质量比为35:65、促透剂的添加剂量为8%、药液与基质质量比为1:10。

2.3 乳膏的制备

2.3.1 ATY乳膏的制备 称取处方量硬脂酸、单硬脂酸甘油酯和尼泊金乙酯, 于1000 mL蒸发皿中80℃水浴加热熔融后, 加入中链脂肪酸135 g (边加入边搅拌) 搅匀后, 加入提取液90 mL (边加入边搅拌), 1 h后, 加入剩余脂溶性原料, 搅拌均匀后加入促透剂, 搅匀既得油相。称取处方量十二烷基硫酸钠加入纯净水中, 80℃水浴加热融化十二烷基硫酸钠, 再加入处方量的甘油, 既得水相。制备好的油相加入水相中, 边加边搅拌, 搅拌均匀, 保鲜膜密封避光放凉即得。

2.3.2 ATY乳膏II的制备 除把中链脂肪酸替换为薄荷油外, 其余操作同2.3.1项下的制备方法。

2.4 药效学实验

2.4.1 ATY乳膏及ATY乳膏II对小鼠痛阈值的影响

2.4.1.1 方法 将小鼠置于热板仪[温度为(55±0.5)℃]上, 从小鼠足底接触热板至出现舔后足的时间为该小鼠的痛阈值, 5 s<痛阈值<30 s的小鼠为合格。选择痛阈值合格小鼠30只, 随机分为空白组、ATY乳膏组、ATY乳膏II组, 每组10只小鼠。各组小鼠两后足涂抹给药, 空白组给予0.9%氯化钠溶液0.2 mL/只, ATY乳膏组和ATY乳膏II组给药剂量均为0.4 g/只。每日涂抹3次, 每次涂抹后按摩20 min, 连续给药10 d。各组动物在末次给药后30、60、90、120 min分别测定各小鼠痛阈值(痛阈值超过60 s, 即停止测试, 按60 s记), 各组间痛阈值的比较可以通过柱状图更直观地看出, 具体结果见图4。

表2 ATY乳膏II处方筛选各项考察指标评分

评价项目	1~5分	6~10分	11~15分	16~20分
外观均一性	粗糙, 无光泽	较平整, 略有光泽	平整, 较亮泽	光滑, 亮泽
延展性	结块, 颗粒明显	小颗粒聚结	基本无颗粒	完全无颗粒
离心稳定性	明显分层	轻微分层	基本不分层	完全不分层
耐寒性、耐热性	严重油水分离	轻度油水分离	略微油水分离	无油水分离

表3 ATY乳膏Ⅱ处方综合评分

编号	A	B/%	C	综合评分
1	30 : 70	6	1 : 10	82
2	40 : 60	10	1 : 10	80
3	35 : 65	6	1 : 8	81
4	30 : 70	10	1 : 10	83
5	35 : 65	8	1 : 10	94
6	35 : 65	10	1 : 8	84
7	35 : 65	10	1 : 12	85
8	35 : 65	8	1 : 10	94
9	35 : 65	6	1 : 12	83
10	30 : 70	8	1 : 12	79
11	35 : 65	8	1 : 10	95
12	35 : 65	8	1 : 10	94
13	40 : 60	6	1 : 10	78
14	35 : 65	8	1 : 10	93
15	40 : 60	8	1 : 8	76
16	30 : 70	8	1 : 8	82
17	40 : 60	8	1 : 12	82

表4 ATY乳膏Ⅱ二次多项式方程模型方差分析

项目	平方和	自由度	F值	P值
回归模型	645.50	9	111.57	<0.000 1
A	6.75	1	10.50	0.014 2
B	41.42	1	64.43	<0.000 1
C	2.08	1	3.24	0.114 8
AB	0.25	1	0.39	0.552 7
AC	20.25	1	31.50	0.000 8
BC	0.25	1	0.39	0.552 7
A ²	295.33	1	459.40	<0.000 1
B ²	100.07	1	155.66	<0.000 1
C ²	145.33	1	226.07	<0.000 1
剩余	4.50	7		
失拟值	2.50	3	1.67	0.309 9
误差	2.00	4		
总和	650.00	16		

2.4.1.2 结果 与空白组比较, ATY乳膏和ATY乳膏Ⅱ均可显著提高小鼠痛阈值 ($P<0.01$), 且改进后的ATY乳膏Ⅱ比ATY乳膏效果更好, 结果见表5。

2.4.2 ATY乳膏和ATY乳膏Ⅱ对小鼠的镇痛作用

2.4.2.1 造模、分组与给药 分组与给药同2.4.1.1, 连续给药10 d。末次给药6 h后, 每只小鼠腹腔注射0.6%冰醋酸0.2 mL, 记录注射后15 min内因疼痛发生扭体的次数及开始出现扭体反应的时间(即扭体反应潜伏期)。

2.4.2.2 结果 与空白组相比较, ATY乳膏组和

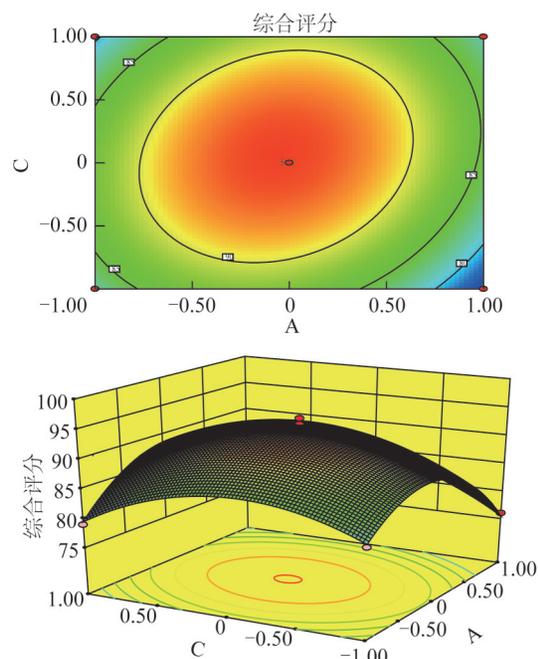


图1 油/水相质量比与药液与基质质量比等高线图与响应面图

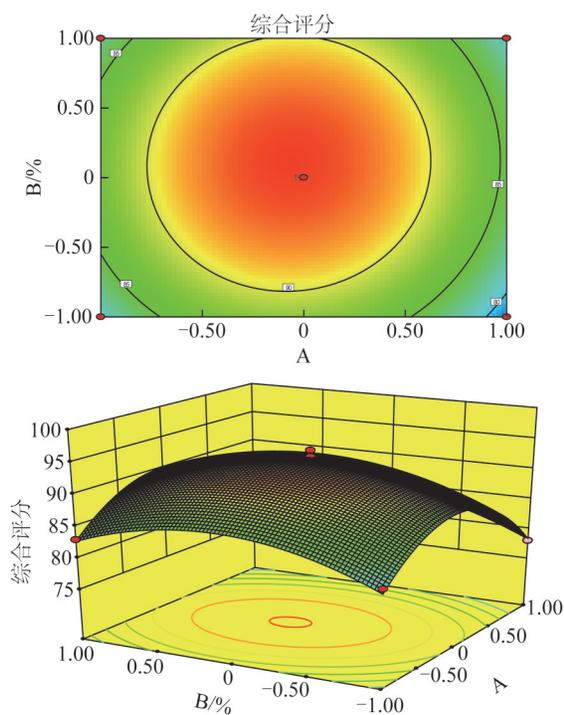


图2 油/水相质量比与促透剂的添加剂量等高线图与响应面图

ATY乳膏Ⅱ组小鼠扭体反应次数明显减少 ($P<0.01$), 扭体反应潜伏期明显增长 ($P<0.01$), 且改进后的ATY乳膏Ⅱ比ATY乳膏镇痛效果更好。将各组小鼠镇痛作用绘制成柱状图, 可以直观地看出, 模型组与空白组和给药组之间差异有统计学意义, 说明药效较好, 结果见图5。

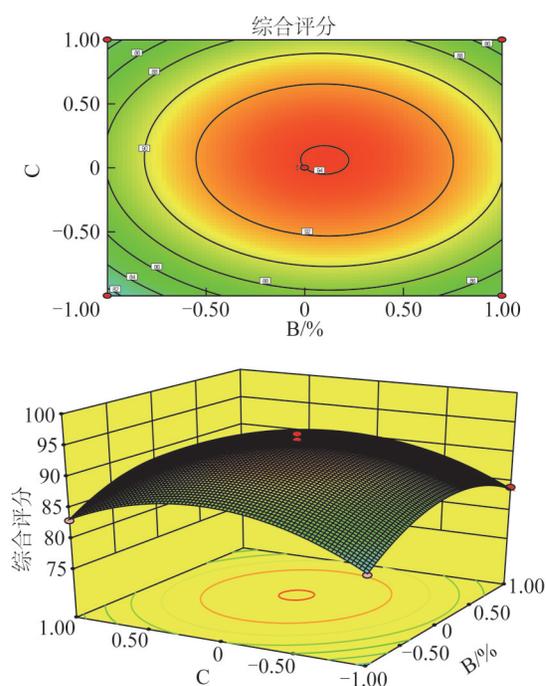
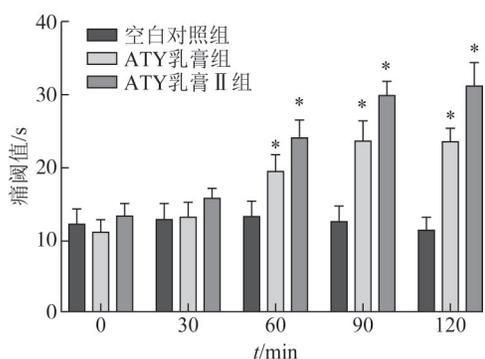


图3 促透剂的添加剂量与药液与基质质量比等高线图与响应面图



注：与空白组相比，* $P < 0.01$ ，图5同。

图4 ATY乳膏和ATY乳膏Ⅱ对小鼠痛阈值的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.4.3 ATY乳膏和ATY乳膏Ⅱ对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

2.4.3.1 方法 将小鼠随机分为3组，分别为模型对照组、ATY乳膏组和ATY乳膏Ⅱ组。在小鼠左耳前后均匀给药，空白组给予0.9%氯化钠溶液0.2 mL/只，

ATY乳膏组和ATY乳膏Ⅱ组给药剂量为0.4 g/只。给药6 h后，小鼠左耳里、外两面涂抹二甲苯0.05 mL，右耳不涂为正常对照。15 min后处死小鼠，剪下双耳，用9 mm内径打孔器在双耳的同一部位打孔并称质量。计算小鼠耳肿胀度。

$$\text{肿胀度} = \text{左耳质量} - \text{右耳质量} \quad (2)$$

2.4.3.2 结果 与空白组相比较，模型对照组小鼠耳肿胀程度显著增高 ($P < 0.01$)，说明造模成功；与模型对照组相比较，ATY乳膏组和ATY乳膏Ⅱ组可显著降低二甲苯致小鼠耳肿胀的程度 ($P < 0.01$)。结果见表6。

3 讨论

艾天羊肌肉关节通络方以乳香、没药为君药。乳香、没药配伍应用始见于“乳香止痛散”（《证治准绳》）^[3-4]。其中，乳香味辛，性温，芳香，具有调气活血，治疗痈疮肿毒、跌打损伤的作用；没药性平，具有治疗跌打损伤、金疮、筋骨、痈疽肿痛等作用。现代医学也已表明，乳香具有抗炎抗菌、抗氧化等药理作用^[5-6]。没药具有抗炎、凝血、镇痛等药理作用^[7-8]。乳香没药同用，可以同时活血祛瘀、消炎镇痛，协同增效。自古以来，临床应用中运用乳香活血、没药散血的功效，且两者皆能止痛消肿，因此，两者常以药对形式相兼而用。现代实验研究也表明，乳香、没药配伍后产生的药效在药理作用的层面上也体现为协同增效^[9-11]。除此之外，本方中添加的薄荷性凉，芳香升散，有解热、抗炎、镇痛等作用。已有研究表明，薄荷油可刺激中枢神经，使皮肤毛细血管扩张，促进汗腺分泌，增加散热，有发汗解热作用^[12]。因此，薄荷油的添加对于该方的临床应用和患者的使用感受均有不可替代的作用。

“药辅合一”，是指制剂处方中部分中药兼任原料和辅料的双重角色。2010年，国家已经把药用辅料的开发列入了重点研究课题^[13]；2016年，《国

表5 ATY乳膏和ATY乳膏Ⅱ对小鼠痛阈值的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药前痛阈值/s	给药后不同时间痛阈值/s			
		30 min	60 min	90 min	120 min
空白组	12.17±2.05	12.88±2.03	13.21±2.02	12.68±1.98	11.60±1.39
ATY乳膏组	11.23±1.49	13.34±1.85	19.73±1.98*	23.91±2.40*	23.73±1.72*
ATY乳膏Ⅱ组	13.64±1.44	15.94±1.09*	24.28±2.20*	30.10±1.57*	31.21±3.17*

注：与空白组相比，* $P < 0.01$ ；表6同。

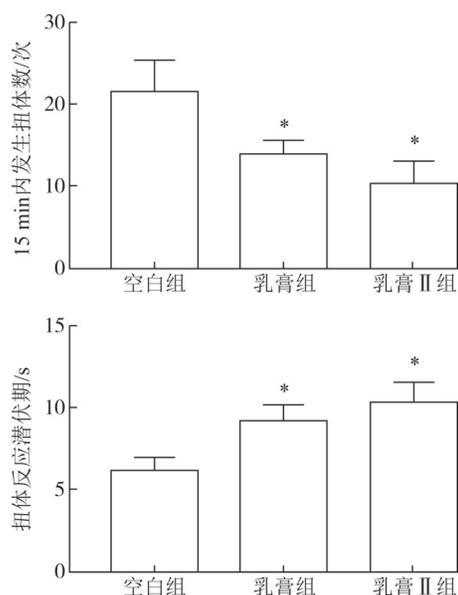


图5 ATY乳膏和ATY乳膏II对小鼠镇痛作用的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

表6 ATY乳膏和ATY乳膏II对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	肿胀度/mg	抑制率/%
模型对照组	12.43±1.47 [▽]	
ATY乳膏组	6.99±1.24 [*]	43.77
ATY乳膏II组	5.80±0.67 [*]	53.34

注:与空白组相比,[▽] $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.01$ 。

家重点支持的高新技术领域》中也将制剂新辅料开发纳入其中,因此,药用辅料已经成为了研究热点。本研究所研制的外用制剂,增加药物的渗透性是关键。因此,结合“药辅合一”的理念,考虑到中药的某些挥发油或芳香成分能促进药物的吸收与跨膜转运,并且其本身的药理活性可以治疗疾病的双重特点,可以考虑将其作为透皮促进剂^[4]。所以本方中的薄荷油既作为乳膏中的油相,起到承载脂溶性提取物及构建乳膏的作用,还能够发挥促进药物透皮吸收、止痛、疏风散寒等作用,既充当着辅药,保证临床药效,又可以作为辅料制成制剂成型,有效地减少了合成促透剂的使用量,一定程度上减轻了不良反应,提高了制剂的安全性。

4 结语

综上所述,本研究对于薄荷油的利用是对“药辅合一”思想的合理诠释,也为今后薄荷油的综合开发提供了理论基础,因此,未来应该给予“药辅合一”研究更多重视,这不仅有利于提高中药制剂

的药效,还能推动中药现代化的发展,使中医药文化一直维持生命活力,也使中华瑰宝在世界大放异彩。

参考文献

- [1] 陈娇.三七跌打损伤软膏的药学研究[D].成都:成都中医药大学,2017.
- [2] 祁金玉,李娜坤,刘黎瑶,等.紫苏叶提取物乳膏剂的处方研究[J].天津农学院学报,2019,25(3):66-69.
- [3] 张桂荣,李蜀平,刘冬平,等.跌打正骨软膏治疗急性软组织损伤的实验研究[J].世界中西医结合杂志,2013,8(7):679-682.
- [4] 朱小芳,管咏梅,刘莉,等.乳香、没药药对的研究进展[J].江西中医药,2016,47(12):74-77.
- [5] WECKESSER S, ENGEL K, SIMON-HAARBAUS B, et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance [J]. Phytomedicine, 2007, 14(7):508-516.
- [6] BANNO V, AKIBISA T, YASUKAWA K, et al. Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri* [J]. Ethnopharmacology, 2006, 28(10):249-253.
- [7] SU S, WANG T, DUAN J A, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha* [J]. Ethnopharmacology, 2011, 134(2):251-258.
- [8] WU X S, XIE T, LIN J, et al. An investigation of the ability of elemene to pass through the blood brain barrier and its effect on brain carcinomas [J]. Pharm Pharmacol, 2009, 16(12):1653-1656.
- [9] 蒋海峰,宿树兰,欧阳臻,等.乳香、没药提取物及其配伍对血小板聚集与抗凝血酶活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):160-165.
- [10] DE RAPPER S, VUUREN S FVAN, KAMATOU G P, et al. The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and myrrh oils—a combination from the pbaraoenic ma pbarma copoeia [J]. Lett Appl Microbiol, 2012, 54(4):352-358.
- [11] 张朋,马骏,宋薇,等.乳香没药药对不同配比对无水乙醇致小鼠胃溃疡的保护作用[J].甘肃中医学院学报,2009,26(1):12-13.
- [12] 张荣发,杨宗发,江尚飞.薄荷油的药理毒理作用研究进展[J].中国药业,2012(19):7-9.
- [13] 戴胜云,徐冰,史新元,等.中药质量源于设计方法和应用:产品和工艺设计[J].世界中医药,2018,13(3):550-555.
- [14] 张定堃,傅超美,林俊芝,等.中药制剂的“药辅合一”及其应用价值[J].中草药,2017,48(10):1921-1929.

(收稿日期:2019-11-18 编辑:王笑辉)