

消痛灵喷雾剂的工艺优化及对小鼠的抗炎镇痛作用*

梁语嫣^{1**}, 彭梅², 杨小生^{1,2}, 陈发菊², 罗忠圣², 杨礼寿², 邓廷飞², 王丽², 王道平², 杨娟^{1,2***}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

[摘要] 目的: 对消痛灵喷雾剂的制备工艺优化, 观察最优工艺制备的喷雾剂对小鼠的抗炎镇痛作用。方法: 采用 L9(4³) 正交实验, 以水杨酸含量为考察指标, 优选出最佳制备工艺; 将小鼠随机分为空白组、阳性组和消痛灵高、中、低剂量组, 采用二甲苯致小鼠耳肿胀法、蛋清致小鼠足趾肿胀法观察最佳工艺制备的喷雾剂对小鼠的抗炎作用, 采用醋酸扭体法观察喷雾剂对小鼠的镇痛作用。结果: 影响消痛灵喷雾剂中水杨酸提取率的各因素主次顺序为浸泡天数、乙醇浓度、料液比及粉粒度, 最佳制备工艺的浸泡时间为 7 d, 乙醇浓度为 75%, 液料比为 1:5, 药材过 10 目筛; 最佳工艺制备的喷雾剂能显著降低二甲苯所致试验小鼠耳廓肿胀 ($P < 0.05$) 及蛋清引起的小鼠足趾肿胀 ($P < 0.05$), 能够减少醋酸所致小鼠扭体次数 ($P < 0.05$), 且与阳性药效果相当。结论: 优选出消痛灵喷雾剂最佳制备工艺, 最佳工艺条件下制备的喷雾剂具有较好的抗炎镇痛作用。

[关键词] 中草药; 工艺学; 制药; 消炎药; 非甾类; 水杨酸; 消痛灵喷雾剂

[中图分类号] R28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)02-0174-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.02.009

Study on Process Optimization and Anti-Inflammatory and Analgesic Effect of Xiaotongling Spray

LIANG Yuyan^{1,2}, PENG Mei², YANG Xiaosheng^{1,2}, CHEN Faju², LUO Zhongsheng²,
YANG Lishou², DENG Tingfei², WANG Li², WANG Daoping², YANG Juan^{1,2}

(1. School of Pharmacology, Guizhou Medical University, Guiyang 5500025, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To optimize process and study the anti-inflammatory and analgesic effects of xiaotongling spray. **Methods:** L9(4³) orthogonal experiment was adapted to optimize the preparation process with salicylic acid content as the index. The mice were randomly divided into blank group, positive control group and groups with high, medium and low doses of xiaotongling spray. Xylene-induced auricle swelling and toe swelling induced by egg white method were applied to observe the anti-inflammatory effects of xiaotongling spray, which was produce with prime process; the acetic acid writhing method in mice was taken to observe the analgesic effects of xiaotongling spray. **Results:** Influencing order of salicylic acid extraction rate in xiaotongling spray was as follows: immersion time (A) > ethanol dose (B) feed liquid rate (C) particle size (D); optimum process as follows: immersing for 7 days, the ethanol dose as 80%, feed liquid rate as 1:5 and the powder particle size was 10 mesh sieve. Xiaotongling spray can significantly inhibit xylene-induced auricle swelling ($P < 0.05$) and egg white-induced foot swelling in mice ($P < 0.05$). Xiaotongling spray can also reduce the writhing times

*[基金项目] 贵州省科技计划项目[黔科合(2016)支撑 2824]; 贵阳市高新区科技项目(GXCX-2018-001)

** 贵州医科大学药学院 2016 级研究生

*** 通信作者 E-mail: yangxz2002@126.com

induced by glacial acetic acid in mice ($P < 0.05$), and it equal to the positive drug effect. **Conclusion:** The optimum process and the Xiaotongling spray produced in such process has obvious anti-inflammatory and analgesic effects.

[**Key words**] drugs, Chinese herbal; technology, pharmaceutical; anti-inflammatory agents, non-steroidal; salicylic acid; xiaotongling spray

消痛灵喷雾是本课题组研发的一种治疗跌打损伤的中药复方制剂,由透骨香、防风等几味药材组成,透骨香在配方中作为君药。透骨香 *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehd 为杜鹃花科植物滇白珠全草或根^[1],有抑菌、抗氧化、活血通络^[2]、顺气平喘^[3]的功效,被我国少数民族广泛用于治疗风湿性关节炎^[4-5]。现代药理学研究显示,透骨香中的水杨酸具有消炎镇痛、杀菌等多重药效作用,长期以来一直作为临床药物被广泛使用^[6-7],因此,在制备消痛灵工艺条件中,以配方中的水杨酸含量作为考察指标。课题组的前期研究基础表明,消痛灵喷雾剂的配方中主要含挥发油等成分,喷雾剂中的挥发性成分对小鼠跌打损伤也具有比较显著的治疗作用。因此为了保证消痛灵喷雾剂临床疗效的稳定性和连续性,本研究在不破坏配方的挥发性成分的基础上,沿用民间外敷或榨汁擦抹的方法,在制备工艺中采用乙醇为提取溶剂、冷浸法进行提取,以透骨香中水杨酸为指标,选择 4 个因素运用 $L_9(4^3)$ 正交实验,选出最佳制备工艺;并采用最佳工艺制备消痛灵喷雾,观察该喷雾剂对二甲苯致小鼠耳肿胀、蛋清所致小鼠足肿胀及醋酸致小鼠扭体的影响,为药物的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 昆明种小鼠,体质量(20 ± 2)g,雌雄各半,中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供。合格证号 SCXK-(军)2012-0011。

1.1.2 药物 透骨香、防风等 4 种药材(购买于贵州贵阳市万东桥中药材市场),贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为正品。云南白药气雾剂(国字标准 Z53021107)。

1.1.3 试剂及仪器 冰醋酸(成都市科龙化工试剂厂),食用乙醇、二甲苯(天津富宇精细化工公司),水杨酸(中国食品药品检定研究院,批号 NIC-100106),甲醇(色谱纯,上海星可高纯溶剂有限公司),UV-1800 型紫外分光光度计(日本岛津公

司),1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),JA2003 精密电子天平(上海浦春剂量仪器有限公司),YLS-Q4 型鼠耳打孔器(北京吉安得尔科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 正交试验设计^[8-9] 通过预实验确定水杨酸提取主要影响因素为乙醇浓度、料液比、渗漉时间及粉碎度,从而选取浸泡天数(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)、粉碎度(D)作为考察因素,设计 3 个水平,以水杨酸的含量为指标,设计 $L_9(4^3)$ 正交实验,见表 1。

表 1 消痛灵喷雾剂 $L_9(4^3)$ 正交试验设计表

Tab. 1 Orthogonal test design of Xiaotongling spray $L_9(4^3)$

水平	因素			
	A/d	B(%)	C/倍	D/目
1	4	65	4	10
2	7	75	5	20
3	10	85	7	60

注:A 为浸泡天数,B 为乙醇浓度,C 料液比为,D 为粉粒度。

1.2.2 水杨酸含量测定^[10-11] 色谱柱为 Gemini-Nx 色谱柱($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$),流动相为甲醇-水(甲醇与水为 35:65),检测波长 306 nm,柱温为 30°C ,流速为 1.0 mL/min ,进样量为 $5.0 \mu\text{L}$,理论板数按水杨酸计应不低于 3 000。

1.2.3 制备试药 将透骨香、防风等 4 味药材按本课题组前期研究的药材比例称取共 50.00 g,置于 1 000 mL 锥形瓶中,按工艺优选后的乙醇浓度、料液比、浸泡时间,粉碎粒,依照冷浸法,过滤,稀释为乙醇浓度 40%,待用。消痛灵喷雾剂以优选出最佳工艺制备作为高剂量(以含生药材量计 0.16 g/L)。

1.2.4 二甲苯致小鼠耳肿胀实验 50 只小鼠随机均分为对照组(生理盐水)、阳性组(云南白药喷雾剂)、消痛灵喷雾剂高、中、低剂量组(0.16 、 0.08 及 0.04 g/L),将相应药物涂于小鼠耳部与腹部,3 次/d,连续 5 d。第 5 天各组小鼠右耳两面均匀涂

抹相应药物 1 次,给药 30 min 后,各组小鼠右耳两面均匀涂抹二甲苯 30 μL ,2 h 后麻醉状态下处死小鼠,剪下左右耳,用直径 8 mm 打孔器打下同一部位耳片,称取质量,计算肿胀率及抑制率^[12-14]。

1.2.5 对小鼠蛋清所致足肿胀的影响^[15-17] 分组及给药时间同“1.2.4”,将各组相应药物涂于小鼠足部与腹部。末次给药前以螺旋测微仪测量右后足跖厚度,作为致炎前右后足正常厚度,在末次给药 30 min 后,取 10% (v/v) 鸡蛋清生理盐水溶液 0.1 mL 于小鼠右后足跖中部皮下注射致炎并标记,并记录注完时间。分别测量各组小鼠致炎前后 0.5、1 及 2 h 右后足跖厚度,减去致炎前足跖厚度,计算足肿胀。

1.2.6 醋酸扭体实验^[18-20] 分组及给药时间同“1.2.4”,各组小鼠腹部去毛,暴露 2 cm \times 2 cm 的皮肤为给药区。末次给药 30 min 后,每只小鼠腹腔注射 1% 冰醋酸 0.2 mL,记录注射后 15 min 内小鼠扭体次数。

1.3 统计学方法

统计学方法应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正交试验及方差分析

以表 2 中的极值 R 进行分析,各指标因素影响的主次顺序是 $A > B > C > D$,根据 K 值进行比较可得,A 因素中 K3 值最大,B 因素中 K2 值最大,C 因素中 K2 值最大,D 因素中 K1 值最大。表 3 中,将离差平方和最小的项近似作为误差的估计,用来计算各因子列的 F 比值,可以看出 A 因素的 3 个水平存在较大差异,对实验的结果影响较大,B、C 和 D 因素的 3 个水平对实验结果影响较小,结合表 3 方差分析可以得出最佳提取工艺为 $A_3B_2C_2D_1$,即最佳方案:浸泡时间为 7 d、浓度为 75% 乙醇、液料比为 1:5,药材过 10 目筛大小,使用时将配置出的配方稀释至含乙醇浓度为 40% 即可。

2.2 消痛灵喷雾对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的影响

结果显示,不同剂量组治疗后的肿胀抑制率存在差异,各治疗组均有抑制作用,其中中剂量组显

著抑制二甲苯所致耳廓肿胀,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且肿胀率、抑制率接近阳性组。见表 4。

表 2 消痛灵喷雾剂 L9(4³) 正交试验结果

Tab. 2 Orthogonal test results of xiaotongling spray L9 (4³)

实验次数	A/t	B(%)	C/倍	D 粉粒 度/目	水杨酸浓 度/(g/L)
1	4	65	4	10	1.02
2	4	75	5	20	1.62
3	4	85	7	60	1.04
4	7	65	5	60	2.31
5	7	75	7	10	2.76
6	7	85	4	20	2.08
7	10	65	7	20	2.60
8	10	75	4	60	2.69
9	10	85	5	10	2.79
K1	3.68	5.93	5.79	6.57	
K2	7.12	7.07	6.71	6.3	
K3	8.08	5.9	6.4	6.04	
R 值	1.47	0.39	0.31	0.18	

注:A 为浸泡天数,B 为乙醇浓度,C 料液比为,D 为粉粒度,R 为同列 Ki 的极值。

表 3 消痛灵喷雾剂制备工艺方差分析表

Tab. 3 Variance analysis table of preparation process of xiaotongling spray

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	3.59	2	1.79	74.74	0.01
B	0.29	2	0.14	6.15	0.13
C	0.25	2	0.07	3.05	0.24
D	0.04	2	0.024		
误差	0.04	2	0.024		
总和	4.08				

注:A 为浸泡天数,B 为乙醇浓度,C 料液比为,D 为粉粒度。

表 4 消痛灵喷雾剂对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响

Tab. 4 Effects of xiaotongling spray for xylene-induced ear swelling in mice

组别	肿胀率(%)	抑制率(%)
对照组	80.59 \pm 9.17	—
阳性组	62.67 \pm 10.96 ⁽¹⁾	21.97
高剂量	68.54 \pm 11.77	17.21
中剂量	61.43 \pm 12.98 ⁽¹⁾	20.05
低剂量	72.80 \pm 6.13	13.49

注:“-”为不做计算,⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 消痛灵喷雾对蛋清致小鼠足肿胀影响

结果显示,与对照组比较,消痛灵喷雾剂高、中剂量组给药 30 min 及给药 90 min,高剂量组给药 60 min,小鼠足趾肿胀度均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 消痛灵喷雾剂对蛋清致小鼠足趾肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.5 Effects of xiaotongling spray for egg white-induced paw swelling in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	足趾肿胀度/mm		
	给药 30 min	给药 60 min	给药 90 min
对照组	1.22 \pm 0.10	1.31 \pm 0.08	1.37 \pm 0.08
阳性组	0.91 \pm 0.24 ⁽¹⁾	0.98 \pm 0.14 ⁽¹⁾	0.76 \pm 0.13 ⁽¹⁾
高剂量	0.90 \pm 0.13 ⁽¹⁾	0.96 \pm 0.44 ⁽¹⁾	0.72 \pm 0.24 ⁽¹⁾
中剂量	0.93 \pm 0.29 ⁽¹⁾	1.01 \pm 0.21	0.79 \pm 0.15 ⁽¹⁾
低剂量	1.01 \pm 0.32	1.23 \pm 0.09	1.17 \pm 0.21

注:⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 消痛灵喷雾对醋酸所致小鼠疼痛的影响

结果显示,与对照组比较,各治疗组均能在一定程度上抑制醋酸所致的疼痛反应,注射后 15 min 内小鼠扭体次数减少,但与空白对照组比较,仅高剂量组小鼠扭体次数显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明消痛灵喷雾剂对醋酸引起的疼痛有显著的抑制作用。见表 6。

表 6 消痛灵喷雾剂对醋酸致小鼠疼痛的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.6 Effects of xiaotongling spray one pain induced by acetic acid($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	扭体次数/次	抑制率(%)
对照组	35.13 \pm 2.26	—
阳性组	23.22 \pm 3.37 ⁽¹⁾	33.90
高剂量组	22.51 \pm 2.11 ⁽¹⁾	35.92
中剂量组	26.74 \pm 2.27	23.89
低剂量组	30.63 \pm 1.95	12.80

注:⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

炎症是人类疾病中最广泛、最常见的病理过程,是具有血管系统的活体组织对局部损伤的反应。许多研究证明,炎症的发生往往伴随着疼痛反应,并相互影响。本研究中的消痛灵喷雾剂为透骨

香,防风等几味药材组成的复方制剂,其中透骨香中的水杨酸作为一种具有广泛活性的化合物,与阿司匹林的结构母核一致,具有相应非甾体抗炎类药物的药效特征,很早就已被中国、日本及美国等多个国家药典收录^[21-22],因此选作消痛灵喷雾剂工艺优化的考察指标。考虑到组方药材中含有挥发性物质,因此采用冷浸法对其制备,以减少有效物质损失^[23]。课题组的前期研究基础表明,消痛灵喷雾剂的配方中主要含挥发油等成分,喷雾剂中的挥发性成分对小鼠跌打损伤也具有比较显著的治疗作用。因此为了保证消痛灵喷雾剂临床疗效的稳定性和连续性,以及进一步对消痛灵喷雾剂药理学研究提供数据参考。本研究在不破坏配方的挥发性成分的基础上,沿用民间外敷或榨汁擦抹的方法,制备工艺中采用乙醇为提取溶剂,冷浸法进行提取,以透骨香中水杨酸为指标,选择 4 个因素运用 L9(4³) 正交实验,筛选其最佳制备工艺,得出消痛灵喷雾剂的最佳提取工艺为 A₃B₂C₂D₁,即最佳方案为浸泡时间为 7 d、浓度为 75% 乙醇、液料比为 1:5,药材过 10 目筛大小,使用时将配置出的配方稀释至含乙醇浓度为 40% 即可。

为了研究最优工艺条件制备的消痛灵喷雾剂对小鼠消炎及镇痛效果,本研究选用的 2 种炎症动物模型(小鼠足肿胀及小鼠耳肿胀),属于急性炎症模型,可引起组胺、5-羟色胺(5-HT)等炎症介质的释放,导致局部毛细血管通透性亢进、渗出和水肿,红、肿、热、痛等早期急性炎症表现^[24-25]。实验结果表明,与空白组比较,消痛灵喷雾剂中剂量组显著抑制二甲苯致小鼠耳肿胀,同时,高、中剂量组从致炎 30 min 开始可明显抑制足肿胀可持续到 90 min,表明消痛灵喷雾剂具有较强抗炎作用。在镇痛实验中,高剂量组能明显减少醋酸致小鼠扭体次数,且其抑制率与阳性对照组相当。

综上所述,消痛灵喷雾剂的制备工艺为,浸泡时间 7 d、75% 浓度乙醇、液料比为 1:5、药材过 10 目筛大小,在最佳工艺条件下制备的消痛灵喷雾剂具有较好的抗炎镇痛效果,为该产品的进一步开发提供了实验依据。

4 参考文献

- [1] 何顺志,徐文芬. 贵州中草药资源研究[M]. 贵阳:贵州科技出版社, 2007.
- [2] 陈应康,余福强,刘大腾,等. 苗药透骨香抗急性痛风性

- 关节炎作用的实验研究[J]. 中药材, 2016, 39(9): 2118-2121.
- [3] 肖壮, 朱成华, 唐涛. 滇白珠的药理、毒副作用研究及开发应用进展[J]. 中国药房, 2017, 28(26): 3726-3729.
- [4] 何婷, 赵怡程, 李鹏跃, 等. 滇白珠抗炎镇痛活性部位的化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(17): 3469-3474.
- [5] 赖克道, 王丽, 邓聿胤, 等. 壮药透骨香对胶原诱导型关节炎大鼠的干预效果及作用机制[J]. 广西医学, 2019, 41(01): 67-70+75.
- [6] 殷勇. 水杨酸甲酯衍生物的合成及其抗炎活性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.
- [7] 王丽, 吕纪华, 刘瑛, 等. 壮药透骨香抗类风湿关节炎药物活性部位筛选及机制研究[J]. 药学研究, 2019, 38(1): 8-11.
- [8] 秦龙, 李平, 马克君, 等. 宝肾方胶囊制备工艺优化[J]. 中国药业, 2019, 28(2): 1-4.
- [9] 王云峰, 黄聪, 刘丽宁, 等. 正交试验设计法优选透骨香提取的工艺研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35(4): 21-22.
- [10] 刘晓强, 张岩琛. 高效液相色谱法测定复方氯霉素水杨酸酐中氯霉素及水杨酸含量的方法学建立与验证[J]. 中国药物经济学, 2019, 14(10): 67-76.
- [11] 张荣琴. HPLC 法测定复方苯甲酸软膏中苯甲酸和水杨酸的含量[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(1): 48-50.
- [12] 胡华, 徐小彬, 杨柯. 龙血竭喷雾剂的抗炎镇痛作用研究[J]. 广西中医药, 2018, 41(1): 61-63.
- [13] 邓志勇, 骆海玉, 陈超英, 等. 木荷树皮乙醇提取物抗炎镇痛作用研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2019, 37(1): 181-186.
- [14] 谷捷, 李鑫, 余黄合, 等. 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(5): 32-35.
- [15] 李雪梅, 孙延斌, 周雪, 等. 百华花楸果实抗炎作用的实验研究[J]. 中国当代医药, 2018, 25(33): 30-32.
- [16] 钟沁月, 呼永河, 郑德志, 等. 血痛定喷雾剂消肿及镇痛作用的研究[J]. 西南国防医药, 2018, 28(9): 801-803.
- [17] 付淑媛. 荨蓬膏对蛋清致小鼠足趾肿胀抗炎作用的实验研究[J]. 中国医药指南, 2015, 13(27): 48-49.
- [18] 李鑫, 魏艳霞, 谢志忻, 等. 青藤碱抗炎镇痛药效作用及其机制研究[J]. 中药材, 2017, 40(10): 2445-2448.
- [19] 蔡立民, 谭志超, 袁胜超, 等. 白花丹止痛喷雾剂的抗炎镇痛作用研究[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(5): 724-728.
- [20] 潘景芝, 金莎, 刘雅婧, 等. 刺五加多糖镇痛抗炎作用及其免疫调节机制的研究[J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(10): 74-82.
- [21] 边云, 田凤胜. 清热类中药与阿司匹林的药理作用相似性研究[J]. 医学综述, 2014, 20(23): 4349-4351.
- [22] 刘欣, 饶明月. 丹参协同阿司匹林防治缺血性脑血管病的药理作用研究[J]. 湖北中医杂志, 2018, 40(3): 58-60.
- [23] 田杰, 白玉婷, 王艳平. 超声法与药典冷浸法测定中药饮片浸出物的实验研究[J]. 宁夏医学杂志, 2019, 41(9): 821-823.
- [24] 袁岸, 罗林, 龚小红, 等. 连翘提取物对角叉菜胶和鸡蛋清所致大鼠足肿胀的影响研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(10): 2200-2203.
- [25] 姚茹, 张锐虎, 王璐, 王晨阳, 郭民, 宋国华, 陈朝阳. 莲心碱对佛波酯所致耳肿胀炎症模型小鼠的抗炎作用及机制研究[J]. 中国药房, 2018, 29(17): 2364-2368.
- (2019-11-17 收稿, 2020-01-09 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅