

左金果胶胶囊的处方优化及其对胃溃疡模型大鼠的保护作用[△]

杨贵前^{1*}, 刘文^{1,2#}, 陶玲¹, 沈祥春¹, 宋朔尧¹, 张环¹, 李和蓉¹, 王守莉¹, 石惠云¹(1. 贵州医科大学药学院/贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心/贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室/贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室/天然药物资源优效利用重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵阳 550025)

中图分类号 R944.5; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)19-2327-09
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.19.04



摘要 目的: 优化左金果胶胶囊的处方, 制备对胃溃疡具有保护作用的现代左金果胶胶囊剂。方法: 以果胶、可溶性淀粉、糊精含量为考察因素, 以胶囊剂中颗粒的成型性、吸湿性、流动性为考察指标, 采用正交实验优化左金果胶胶囊的处方。以左金提取物浸膏粉末为原料, 采用湿法制粒填充法制备左金果胶胶囊。采用高效液相色谱法测定左金果胶胶囊中盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量, 并采用转篮法考察该胶囊剂在 0.1 mol/L 盐酸溶液中的体外释药行为。通过灌胃 75% 乙醇复制胃溃疡大鼠模型, 以胃溃疡指数、胃溃疡抑制率和胃组织病理切片结果为指标, 初步考察左金果胶胶囊(剂量分别为 54、108、216 mg/kg) 的胃溃疡保护作用。结果: 左金果胶胶囊的最优处方为果胶含量 45%、可溶性淀粉含量 12%、糊精含量 27%、木糖醇含量 1%。体外释放结果表明, 1 h 时左金果胶胶囊中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱分别释放了 53.76%、54.82%, 二者均在 8 h 左右释放完全, 且均符合零级释放行为。不同剂量左金果胶胶囊均能不同程度地改善胃溃疡模型大鼠胃组织的溃疡损伤, 显著降低其胃溃疡指数($P < 0.01$), 显著升高其胃溃疡抑制率和碘酸雪夫氏染色阳性表达面积百分比($P < 0.01$)。结论: 成功制得对胃溃疡具有保护作用并具有一定缓释效应的左金果胶胶囊。

关键词 左金果胶胶囊; 胃溃疡; 正交实验; 缓释效应; 大鼠

Formulation Optimization of Zuojin Pectin Capsule and Its Protective Effect on Gastric Ulcer Model Rats

YANG Guiqian¹, LIU Wen^{1, 2}, TAO Ling¹, SHEN Xiangchun¹, SONG Shuoyao¹, ZHANG Huan¹, LI Herong¹, WANG Shouli¹, SHI Huiyun¹(1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University/Engineering Center for the Highly Efficient Utilization of Natural Medicine Resources in Guizhou Province/Key Lab for Pharmacology and Pharmacogenesis Evaluation of Natural Medicine in Guizhou Universities/Guizhou Medical University-Guiyang Joint Key Laboratory/Key Laboratory for Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, Guiyang 550025, China; 2. The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To optimize the formulation of Zuojin pectin capsules, and to prepare modern Zuojin pectin capsules with protective effects against gastric ulcers. **METHODS:** The formulation of Zuojin pectin capsules was optimized with orthogonal test with the contents of pectin, soluble starch and dextrin as factors, using formability, moisture absorption and flow ability as indicators. Zuojin pectin capsule was prepared by wet granulation filling method with Zuojin extract powder as raw material. The contents of palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride, evodiamine and rutaecarpin were evaluated by HPLC. Basket method was used to investigate the release behavior of the capsule in 0.1 mol/L HCl solution. The gastric ulcer model of rats was established by intragastric administration of 75% ethanol. Gastric ulcer index, the inhibition rate of gastric ulcer and the pathological sections were used as indexes to investigate the protective effect of Zuojin pectin capsules (the doses were 54, 108, 216 mg/kg) on gastric ulcer. **RESULTS:** The optimal formulation of Zuojin pectin capsules included 45% pectin, 12% soluble starch, 27% dextrin and 1% xylitol. Results of *in vitro* drug release showed that palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in Zuojin pectin capsules released 53.76% and 54.82% respectively within 1 h, completely released at about 8 h, and conformed to the zero-order release behavior. Different doses of Zuojin pectin capsule could improve the ulcer injury of gastric tissue in gastric ulcer model rats to different extent, and significantly reduced the gastric ulcer

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81860706, No.81660666); 贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2018]1016号, No.黔科合基础[2019]1024号); 贵州省国内一流建设学科项目(中药学)(No.GNYL[2017]008号)

* 硕士研究生。研究方向: 药物新剂型与新技术。E-mail: 2492109374@qq.com

通信作者: 教授, 博士生导师, 硕士。研究方向: 药物新剂型与新技术。电话: 0851-86823742。E-mail: 642771631@qq.com

index ($P<0.01$), significantly increased the inhibition rate of gastric ulcer and the percentage of positive expression area of Schiff's iodate staining ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Zuojin pectin capsule with protective effect on gastric ulcer and certain sustained-release effect is successfully prepared.

KEYWORDS Zuojin pectin capsule; Gastric ulcer; Orthogonal test; Sustained-release effect; Rat

胃溃疡是一种发生在胃部的溃疡疾病,是临床常见且十分危险的消化系统疾病之一。据报道,全世界近10%的人在生命的某个阶段曾患过胃溃疡^[1]。该病具有病程长、并发症发生率高、复发率高的特点^[2],严重影响患者的生活质量。其中以乙醇所致的急性胃溃疡较为常见,摄入过量乙醇可导致胃黏膜损伤、胃黏膜血管内皮细胞凋亡,目前多采用药物控制的方案来缓解胃溃疡患者的临床症状^[3]。

左金丸出自《丹溪心法·卷一》,以黄连和吴茱萸按质量比6:1组成,为元代医家朱丹溪名方之一,具有清肝泻火、降逆止呕的功效,是中医以反佐法组方的经典方剂,主要用于肝火犯胃型急慢性胃炎、反流性食管炎、功能性胃肠疾病、慢性萎缩性胃炎、消化道溃疡等疾病的治疗^[4]。但传统左金丸是将药材打粉后以水泛丸,需频繁服药,且其对胃肠道有一定的刺激性^[5]。本课题组前期研究发现,该刺激性可能是黄连本身的苦寒效应所致。目前,市售左金片和左金胶囊是在传统左金丸的基础上,仅简单地添加稀释剂后包薄膜衣或填充胶囊制得,虽可在一定程度上缓解黄连对胃的直接刺激,但仍不能避免由于胃排空效应所导致的需频繁用药问题。

果胶是一类广泛存在于植物细胞壁的初生壁和中间片层中的杂多糖,其在酸性介质中能形成高黏度溶胶,该溶胶与溃疡面的亲和力强,可在胃黏膜表面形成一层牢固的保护膜^[6]。相关研究指出,果胶可作为药用辅料,具有抑菌、止血以及延长药物在病灶部位滞留时间的作用^[7]。鉴于此,本课题组拟在传统左金丸的基础上,创新性地加入果胶为稀释剂制备左金果胶胶囊,以成型性、吸湿性、流动性为考察指标,采用正交实验优化左金果胶胶囊处方;并以胃溃疡指数、胃溃疡抑制率和胃组织病理切片考察结果为指标,初步考察按最优处方所制左金果胶胶囊对大鼠胃溃疡的保护作用。本研究拟借助果胶的优点,发挥中药制剂“药辅合一”的特色,从而延长药物在胃内的滞留时间,达到减少用药量和减少中药苦寒败胃的直接刺激作用,为传统中药剂型的现代化开发奠定实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

UltiMate 3000型高效液相色谱(HPLC)仪(包括系统控制器、输液泵、脱气组件、低压梯度组件、自动进样器、柱温箱、温控样品室、二极管阵列检测器、Chromleon 7.0色谱数据工作站)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;ME104/02型万分之一电子天平购自梅特勒-

托利多仪器(上海)有限公司;BS-223S型百分之一分析天平购自北京赛多利斯仪器系统有限公司;ZNHW型电热套购自上海锦赋实验仪器设备有限公司;SHZ-D(Ⅲ)型循环水式多用真空泵购自郑州博科仪器设备有限公司;DK-98-II型电热恒温水浴锅购自天津市泰斯特仪器有限公司;HB ECO S096型旋转蒸发仪购自德国IKA公司;KQ 3200型超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;GZX-9070MBE型电热鼓风干燥机购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂;RC-8型溶出度试验仪购自天津盛达三合光学仪器有限公司。

1.2 主要药品与试剂

黄连(批号170801)购自贵州同济堂药店,吴茱萸(批号170801)购自北京同仁堂药店,以上药材经贵州中医药大学药学院周汉华教授鉴定均为真品;胶体果胶铋胶囊[批号20200603,规格50 mg(以铋计)]购自山西新宝源制药有限公司;盐酸巴马汀对照品(批号110732-201309,纯度87.4%)、盐酸小檗碱对照品(批号110800-201406,纯度86.7%)、吴茱萸碱对照品(批号110802-201606,纯度99.6%)、吴茱萸次碱对照品(批号110801-201608,纯度99.4%)均购自中国食品药品检定研究院;糊精(批号20110407)购自天津市科密欧化学试剂有限公司;可溶性淀粉(批号20131006)购自天津市致远化学试剂有限公司;果胶(批号20190225,食品级)购自郑州血泉聚合材料有限公司;木糖醇(批号20190403,食品级)购自郑州康源化工产品有限公司;乙醇(批号20190618)购自国药集团化学试剂有限公司;福尔马林(批号20190910)购自重庆江川化工集团有限公司;磷酸二氢钾(批号20180308)购自西陇科学股份有限公司;乙腈、甲醇均为色谱纯,水为超纯水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级SD大鼠,共48只,雄性,体质量(200±20)g,由贵州医科大学动物中心提供,实验动物生产许可证号为SCXK(黔)2018-0001,合格证号为211002300056240。大鼠饲养环境通风良好,温度为18~25℃,相对湿度为40%~70%,12h光照昼夜循环。本研究动物实验方案通过了贵州医科大学实验动物伦理委员会审查批准(编号2000069)。

2 方法与结果

2.1 左金果胶胶囊的制备

将黄连以8倍量(mL/g,下同)60%乙醇加热回流提取3次,每次90min,合并3次提取液,旋转蒸发挥发干提取液中乙醇及大部分的水分,得黄连浸膏液。将吴茱萸

以12倍量85%乙醇加热回流提取3次,每次60 min,合并3次提取液,旋转蒸发挥发干提取液中乙醇及大部分的水分,得吴茱萸浸膏液。将黄连浸膏液与吴茱萸浸膏液分别在60℃鼓风烘箱中烘干,分别得黄连干浸膏和吴茱萸干浸膏;将上述浸膏分别粉碎过六号筛,并按黄连干浸膏-吴茱萸干浸膏(6:1, m/m)进行配伍,即得左金提取物浸膏粉末^[8]。

取处方量的木糖醇,以等量递加法加入处方量的果胶,并同法加入可溶性淀粉和糊精,备用。取左金提取物浸膏粉末适量,以等量递加法加入到上述混合辅料中,再以适量70%乙醇为润湿剂制备软材,挤压过一号筛制粒,60℃烘干。取粒径在一号筛到四号筛之间的颗粒,装胶囊,即得。所制胶囊的规格为每粒0.36 g。

2.2 左金果胶胶囊中有效成分的含量测定

采用HPLC法测定左金果胶胶囊中盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量^[8-11]。

2.2.1 色谱条件 以Agilent ZORBAX XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以0.05 mol/L磷酸二氢钾水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 92% A→80% A; 5~15 min, 80% A; 15~23.5 min, 80% A→75.5% A; 23.5~25 min, 75.5% A; 25~30 min, 75.5% A→74% A; 30~45 min, 74% A→47.5% A; 45~55 min, 47.5% A);检测波长为230 nm;柱温为26℃;流速为1 mL/min;进样量为10 μL。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别称取盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品各适量,置于不同10 mL量瓶中,分别加甲醇溶液超声(功率300 W, 频率40 kHz,下同)5 min充分溶解,放至室温后加甲醇定容,制得盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱质量浓度分别为587.821、89.454 μg/mL的单一对照品溶液。分别取400、300、200、50 μL上述4个单一对照品溶液,置于同一1 mL量瓶中,超声5 min充分混匀,放至室温后加甲醇定容,即得盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱质量浓度分别为234.80、246.30、17.80、22.70 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取左金果胶胶囊内容物适量,置于10 mL量瓶中,加适量甲醇超声5 min使其溶解,放至室温后加甲醇定容;取适量上清液,过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液 按“2.4.1”项下最优左金果胶胶囊处方制备不含左金提取物浸膏粉末的阴性对照胶囊内容物,并按照“2.2.3”项下供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.2.5 方法学考察 参照2020年版《中国药典》(四部)分析方法验证指导原则进行方法学考察^[12]。专属性试验结果显示,供试品溶液与混合对照品溶液在相同保留时间处有相同色谱峰出现,各待测成分色谱峰与相邻色

谱峰的分离度均大于1.5,理论板数均大于6 000,且阴性对照溶液对测定无干扰,表明本方法的专属性较好(色谱图见图1)。以进样量为横坐标($x, \mu\text{g}$)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归后,得到盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的回归方程分别为 $y = 56.066x + 10.6240$ ($R^2 = 0.9994$)、 $y = 76.016x - 0.6379$ ($R^2 = 0.9999$)、 $y = 163.280x + 1.0012$ ($R^2 = 0.9997$)、 $y = 79.668x - 0.0518$ ($R^2 = 0.9999$),分别在1.174~5.870、1.232~6.156、0.089~0.455、0.114~0.568 μg进样量范围内与其峰面积线性关系良好。盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的检测限分别为0.028、0.018、0.003、0.010 μg,定量限分别为0.092、0.059、0.011、0.034 μg;精密度试验的RSD分别为0.96%、0.59%、0.90%、0.81% ($n = 6$),重复性试验的RSD分别为0.18%、0.11%、0.92%、0.38% ($n = 6$),稳定性试验(室温放置12 h)的RSD分别为0.33%、0.10%、0.60%、0.75% ($n = 6$);低、中、高质量浓度溶液中上述4种成分的平均加样回收率分别为98.68%~100.60% (RSD为0.22%~2.83%, $n = 3$)、97.30%~103.06% (RSD为0.24%~2.56%, $n = 3$)、98.65%~101.70% (RSD为0.79%~2.47%, $n = 3$)、98.69%~103.02% (RSD为1.11%~2.83%, $n = 3$),表明本方法的准确度较好。方法学考察中所用左金果胶胶囊的批号均为20201202。

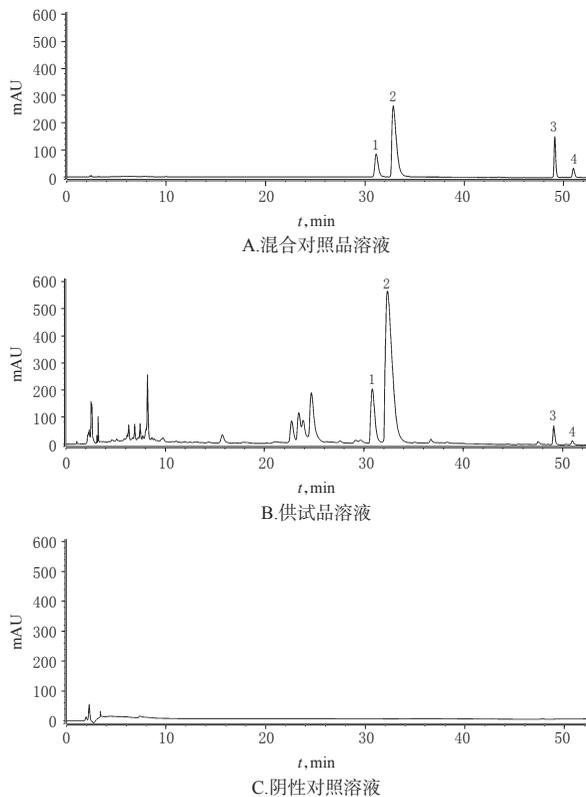
2.3 左金果胶胶囊的质量评价指标

按照2020年版《中国药典》(四部)对颗粒剂检查项目的要求^[12],本研究以成型性、吸湿性、流动性为考察指标对左金果胶胶囊的质量进行考察。

2.3.1 成型性 按照2020年《中国药典》(四部)“粒度和粒度分布测定法”中的双筛分法进行测定^[12]。本研究所用药筛为由一号筛在上、五号筛在下组成的双筛。称取制备好的颗粒10 g,置于一号筛上,保持水平过筛,左右往返,边筛边轻叩3 min。收集能通过一号筛但不能通过五号筛的颗粒,称质量。按下式计算颗粒的成型率:成型率(%)=(通过一号筛而不能通过五号筛的颗粒的质量/样品颗粒总质量)×100%^[13]。

2.3.2 吸湿性 通过测定颗粒的48 h吸湿率考察吸湿性。取底部盛有氯化钠饱和溶液的玻璃干燥器,放入25℃恒温培养箱中干燥24 h,此时干燥器内的相对湿度为75.3%。分别称取各组颗粒样品(已于60℃烘箱中干燥至恒质量)约1 g,置于已干燥至恒质量的称量瓶中,精密称定称量瓶与样品的总质量(M_1);再将装有样品的称量瓶敞口放置于上述玻璃干燥器中48 h后取出,再次精密称定称量瓶与样品的总质量(M_2)。按下式计算颗粒的吸湿率:吸湿率(%)=($M_2 - M_1$)/ $M_1 \times 100\%$ ^[14]。

2.3.3 流动性 以休止角来表征颗粒的流动性。休止角的测定采用固定漏斗法:将3只漏斗串联并固定于水平放置的坐标纸上1 cm的高度处,漏斗下口距坐标纸的



注: 1. 盐酸巴马汀; 2. 盐酸小檗碱; 3. 吴茱萸碱; 4. 吴茱萸次碱

Note: 1. palmatine hydrochloride; 2. berberine hydrochloride; 3. evodiamine; 4. rutaecarpine

图1 混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed control solution, test sample solution and negative control solution

距离计为 H ;将过筛后的颗粒沿漏斗壁倒入最上面的漏斗中,直到最下面漏斗颗粒的圆锥体尖端接触到漏斗口为止,由坐标纸测出圆锥体底部的半径 R ,计算出休止角 $\alpha(\tan\alpha=H/R)^{[14]}$ 。重复测定3次,计算休止角 α 的平均值。

2.4 正交实验优选左金果胶胶囊的处方

2.4.1 正交实验设计及结果 结合文献[12-13]以及前期单因素实验结果,分别以果胶含量(A)、可溶性淀粉含量(B)、糊精含量(C)为考察因素,以胶囊剂中颗粒的成型性、吸湿性、流动性为考察指标,设计3因素3水平正交实验。结合所选指标的重要程度及前期预实验结果,设置3个考察指标的权重分别为成型性30%、吸湿性30%、流动性40%,即成型性得分=30×成型率,吸湿性得分=30-(30×吸湿率),流动性得分=40-(40× $\tan\alpha$)。总分为上述3个指标的得分之和,最高得分为100分。因素与水平见表1,正交实验安排与结果见表2,方差分析结果见表3。

由表2、表3结果可知,各因素对左金果胶胶囊处方得分的影响大小为 $B>C>A$,其中因素 B 对得分有显著影响($P<0.05$)。通过正交实验得到的最优处方为

$A_3B_2C_3$,即果胶含量为45%、可溶性淀粉含量为12%、糊精含量为27%、木糖醇含量为1%。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

| 水平 | 因素 | | |
|----|------|------|------|
| | A, % | B, % | C, % |
| 1 | 25 | 7 | 7 |
| 2 | 40 | 12 | 17 |
| 3 | 45 | 17 | 27 |

表2 正交实验安排与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

| 处方号 | A | B | C | 流动性得分 | 成型性得分 | 吸湿性得分 | 总分 |
|-------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 18.000 | 29.000 | 34.753 | 81.753 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 18.240 | 29.434 | 34.940 | 82.614 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 18.070 | 29.552 | 35.200 | 82.822 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 17.560 | 29.291 | 34.789 | 81.640 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 18.690 | 29.358 | 34.832 | 82.880 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 18.240 | 29.277 | 34.885 | 82.402 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 18.470 | 29.491 | 34.540 | 82.501 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 18.390 | 29.692 | 34.452 | 82.534 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 18.470 | 29.697 | 34.477 | 82.644 |
| K_1 | 247.189 | 245.895 | 246.690 | | | | |
| K_2 | 246.923 | 248.029 | 246.898 | | | | |
| K_3 | 247.679 | 247.867 | 248.203 | | | | |
| R | 0.757 | 2.134 | 1.513 | | | | |

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis result of variance

| 变异来源 | 离差平方和 | 自由度 | 均方 | F | P |
|------|-------|-----|-------|--------|-------|
| A | 0.098 | 2 | 0.049 | 2.166 | |
| B | 0.941 | 2 | 0.470 | 20.751 | <0.05 |
| C | 0.448 | 2 | 0.224 | 9.889 | |
| 误差 | 0.045 | 2 | 0.023 | | |

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.000$

Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.000$

2.4.2 验证实验 按照正交实验筛选出的最优处方平行制备3批左金果胶胶囊(批号分别为20201201、20201202、20201203),分别按“2.4.1”项下评分标准进行质量评价。结果,3批胶囊的平均得分为84.124($RSD=0.46\%$, $n=3$),表明其成型性、吸湿性与流动性均良好且该处方稳定可行。

2.4.3 左金果胶胶囊中4种有效成分的含量测定 取“2.4.2”项下3批左金果胶胶囊(每批10粒),分别将各批次胶囊的内容物混匀后,精密称取内容物0.26 g(相当于每粒胶囊中的内容物量),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算4种成分的含量。结果,4种有效成分在3批左金果胶胶囊中的含量均一[RSD 均小于0.78% ($n=3$)],其含量高低为盐酸小檗碱>盐酸巴马汀>吴茱萸碱>吴茱萸次碱,详见表4。

2.5 左金果胶胶囊的体外释放实验

根据2020年版《中国药典》(四部)通则“0931 溶出度与释放度测定法”中第一法——转篮法进行测定^[12],

表4 3批左金果胶胶囊中4种有效成分的含量测定结果(每0.26 g内容物中的含量)

Tab 4 Determination results of 4 active components in 3 batches of Zuojin pectin capsules (content per 0.26 g)

| 批号 | 盐酸巴马汀, μg | 盐酸小檗碱, μg | 吴茱萸碱, μg | 吴茱萸次碱, μg |
|----------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 20201201 | 4 015.40 | 16 250.75 | 224.09 | 133.10 |
| 20201202 | 4 013.42 | 16 249.90 | 224.14 | 133.18 |
| 20201203 | 4 019.59 | 16 251.93 | 223.41 | 134.94 |

释放介质为0.1 mol/L盐酸溶液,转速为120 r/min。取批号为20201203左金果胶胶囊6粒,分别置于溶出度试验仪的6个转篮中。待释放介质温度恒定在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 后,将6个转篮同时放入释放介质中,并立即启动转篮旋转,分别在0.5、1、2、4、8、12 h时取样10 mL,并及时补充相同体积与温度的溶出介质。将吸取出的溶液过0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液。采用“2.2”项下建立的HPLC法测定续滤液中4种有效成分的含量,并计算其累积释放度(Q)^[15]。结果,左金果胶胶囊中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的体外释放行为近乎一致:在1 h时,左金果胶胶囊中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的 Q 分别为53.76%、54.82%,且二者均在8 h左右释放完全。由 Q 与其对应释放时间 t 拟合盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的释放方程,发现二者均符合零级释放行为。但在体外释放实验中,笔者未检出吴茱萸碱和吴茱萸次碱。盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的累积释放曲线见图2,释药方程拟合结果见表5。

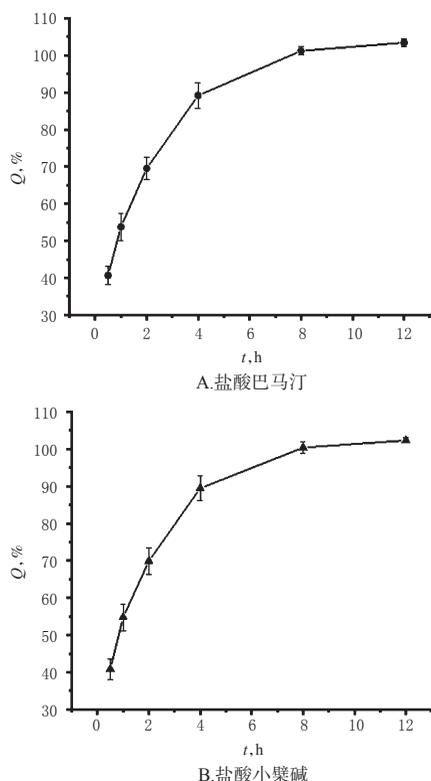


图2 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的累积释放曲线

Fig 2 Cumulative release curves of palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride

表5 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的释药方程拟合结果

Tab 5 Fitting result of release equation of palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride

| 模型 | 盐酸巴马汀 | | 盐酸小檗碱 | |
|----------------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | 拟合方程 | R^2 | 拟合方程 | R^2 |
| 零级释放 | $Q=16.217t-0.137$ | 0.920 8 | $Q=16.175t+0.307$ | 0.917 6 |
| 一级释放 | $\ln(1-Q)=0.576t+1.345$ | 0.572 4 | $\ln(1-Q)=0.575t+1.354$ | 0.569 6 |
| Higuchi释放 | $Q=3.625t^{1/2}+18.948$ | 0.876 3 | $Q=3.613t^{1/2}+19.375$ | 0.872 1 |
| Riger Peppas释放 | $\ln Q=0.702\ln t+0.601$ | 0.895 8 | $\ln Q=0.702\ln t+0.606$ | 0.894 1 |

2.6 左金果胶胶囊对乙醇所致大鼠胃溃疡的保护作用考察

以胃溃疡指数、胃溃疡抑制率和胃组织病理切片考察结果为指标,初步考察按最优处方所制左金果胶胶囊对乙醇所致大鼠胃溃疡的保护作用。

2.6.1 分组、给药与造模 将48只SD大鼠适应性饲养1周后,按随机区组法随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组(胶体果胶铋胶囊内容物,395 mg/kg)、左金果胶胶囊辅料组(155 mg/kg,对应高剂量左金果胶胶囊中所含的辅料量)、左金提取物浸膏粉末组(61.3 mg/kg,对应高剂量左金果胶胶囊中所含的浸膏粉末量)和左金果胶胶囊内容物低、中、高剂量组(54、108、216 mg/kg),每组6只。其中胶体果胶铋胶囊内容物的给药剂量是根据临床剂量换算而得,左金果胶胶囊内容物的给药剂量是参考前期预实验结果设置。正常对照组和模型对照组大鼠灌胃生理盐水,其余各组大鼠分别灌胃相应药物(均以生理盐水为溶剂溶解),灌胃体积均为3 mL,每天灌胃1次,连续7 d。第6天灌胃后,各组大鼠禁食不禁水24 h,然后在第7天灌胃2 h后,正常对照组大鼠灌胃生理盐水(15 mL/kg),其余各组大鼠灌胃75%乙醇(15 mL/kg)制备胃溃疡模型^[1-2]。

2.6.2 胃溃疡指数及胃溃疡抑制率的测定 在灌胃75%乙醇1 h后,将大鼠与乙醚饱和棉球共同置于干燥器内2~5 min,待大鼠麻醉后,将其脱颈椎处死。立即取出其胃组织,并沿胃大弯切开,用冷生理盐水冲洗胃内残留物,然后将胃平铺于平板上,以滤纸吸干水渍,观察并用定距相机记录胃黏膜损伤情况。采用Image-Pro Plus 6.0软件计算大鼠胃溃疡面积与胃总面积,然后计算胃溃疡指数和胃溃疡抑制率[胃溃疡指数(%)=胃溃疡面积/胃总面积 \times 100%;胃溃疡抑制率(%)=(模型对照组胃溃疡面积-给药组胃溃疡面积)/模型对照组胃溃疡面积 \times 100%]。采用SPSS 16.0软件对数据进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时组间两两比较采用LSD检验,方差不齐性时组间两两比较采用非参数检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。各组大鼠的胃组织照片见图3,胃溃疡指数和胃溃疡抑制率测定结果见表6。

由图3和表6结果可知,与正常对照组比较,模型对照组大鼠胃黏膜表面发生了明显的条状充血肿胀,胃黏膜有明显损伤,胃溃疡指数显著升高($P<0.01$)。与模

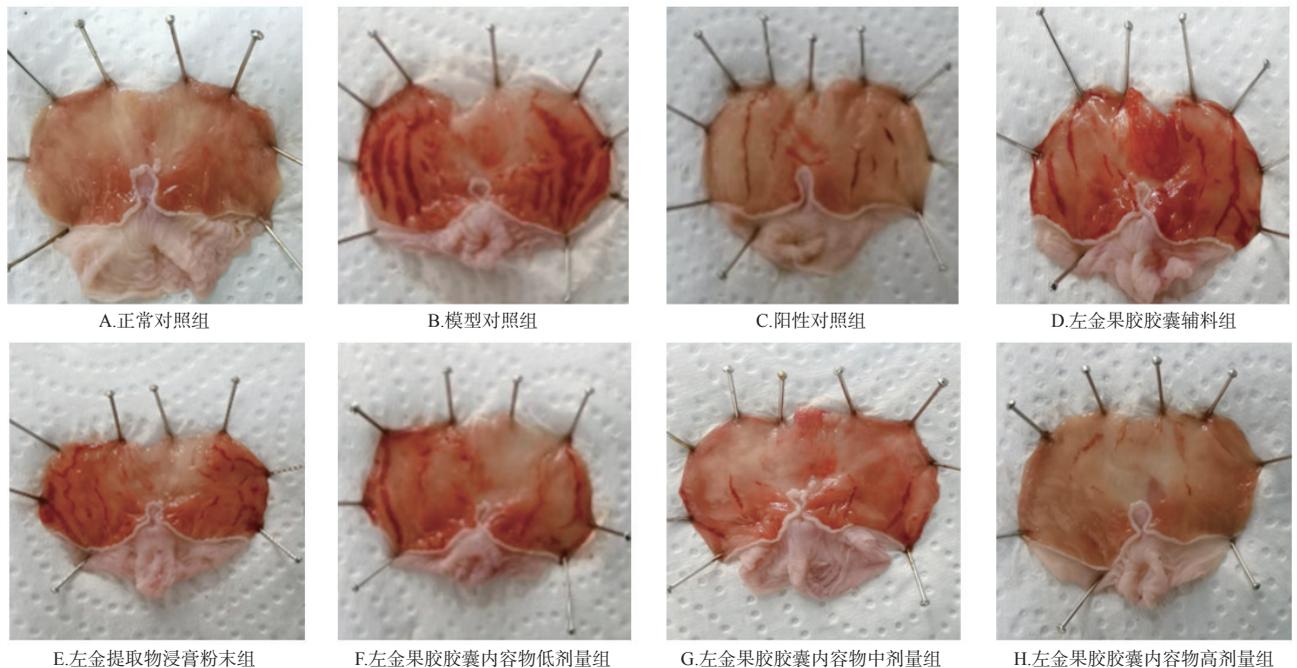


图3 各组大鼠的胃组织照片

Fig 3 Gastric tissue photos of rats in each group

表6 各组大鼠胃溃疡指数和胃溃疡抑制率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 6 Results of gastric ulcer index and gastric ulcer inhibition rate of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 胃溃疡指数,% | 胃溃疡抑制率,% |
|---------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常对照组 | 0 | |
| 模型对照组 | 29.58 ± 1.64** | 0 |
| 阳性对照组 | 7.51 ± 0.74 ^{##} | 78.25 ± 7.77 ^{##} |
| 左金果胶胶囊辅料组 | 17.79 ± 1.00 ^{##ΔΔ} | 37.35 ± 6.98 ^{##ΔΔ} |
| 左金果提取物浸膏粉末组 | 15.30 ± 1.16 ^{##ΔΔ} | 61.91 ± 5.42 ^{##ΔΔ} |
| 左金果胶胶囊内容物低剂量组 | 17.40 ± 0.67 ^{##ΔΔ} | 44.13 ± 5.72 ^{##ΔΔ} |
| 左金果胶胶囊内容物中剂量组 | 15.63 ± 0.98 ^{##ΔΔ} | 61.77 ± 3.42 ^{##ΔΔ} |
| 左金果胶胶囊内容物高剂量组 | 8.87 ± 0.93 ^{##ΔΔ} | 76.63 ± 3.89 ^{##} |

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与阳性对照组比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, ^{##} $P < 0.01$; vs. positive control group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

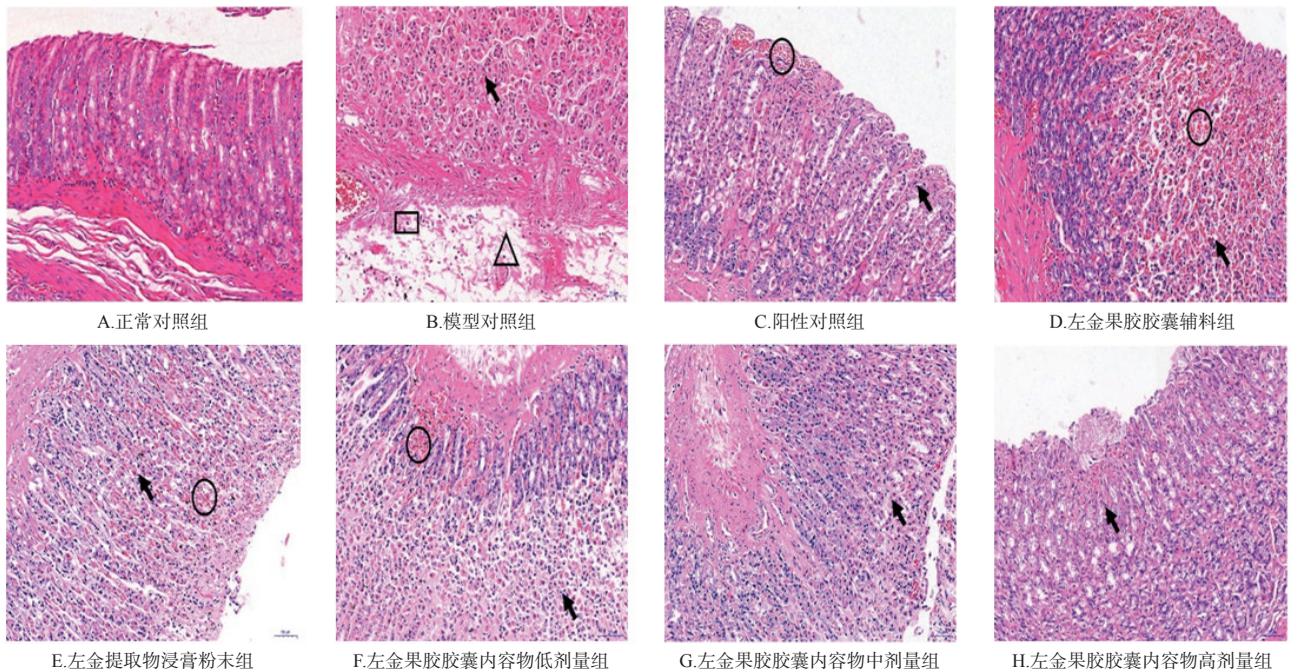
型对照组比较,各给药组大鼠的胃黏膜损伤均不同程度地改善,其胃溃疡指数和胃溃疡抑制率均显著降低($P < 0.01$)。与阳性对照组比较,左金果胶胶囊内容物高剂量组大鼠的胃溃疡抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$),说明高剂量左金果胶胶囊内容物可达到与阳性药物相近的胃溃疡保护作用。

2.6.3 胃组织病理学观察 每组随机选取3只大鼠的胃组织样本进行病理学观察。将胃组织置于4%多聚甲醛中固定24 h,常规制备石蜡切片(5 μm)。取切片分别进行常规苏木精-伊红(HE)染色和碘酸雪夫氏(PAS)染色,常规处理后于显微镜下观察各组大鼠胃组织病理学变化(镜下,PAS阳性表达呈紫红色)。采用 Image-Pro

Plus 6.0 图像分析系统测定所采集的胃组织中全部PAS染色图像的光密度值和面积,计算PAS染色阳性表达面积百分比: PAS染色阳性表达面积百分比(%) = PAS染色阳性表达面积/当前视野测定总面积 × 100%。按“2.6.2”项下方法对数据进行统计分析。各组大鼠胃组织的HE染色显微图见图4,PAS染色显微图见图5,PAS染色阳性表达面积百分比的测定结果见表7。

HE染色结果显示,与正常对照组比较,模型对照组大鼠经乙醇诱导后胃组织黏膜层及黏膜下层受损。其中黏膜上皮细胞变性坏死后脱落或溶解,固有层内大量胃腺坏死,管状结构消失,可见坏死壁细胞的核固缩、胞质溶解或消失;黏膜下层粉染水肿浆液中可见淋巴细胞或中性粒细胞。与模型对照组比较,各给药组大鼠的胃黏膜损伤均不同程度地减轻,胃组织黏膜层、黏膜下层结构均不同程度地修复,细胞溶解和出血灶较少;其中左金果胶胶囊内容物高剂量组大鼠胃组织仅有少量毛细血管轻微充血扩张,黏膜下层内可见少量淋巴细胞或中性粒细胞散在分布,表明高剂量左金果胶胶囊内容物能有效保护乙醇所致的大鼠胃黏膜损伤。

PAS染色结果显示,与正常对照组比较,模型对照组大鼠胃组织的PAS染色阳性表达面积百分比显著降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较,各给药组大鼠胃组织的PAS染色阳性表达面积百分比均显著升高($P < 0.01$),表明各给药组大鼠胃黏液中粘多糖的含量相较于模型对照组均有所增加(酸性粘多糖是胃上皮的主要保护层^[10])。与阳性对照组比较,除左金果胶胶囊内容物低剂量组外,其余各给药组大鼠胃组织的PAS染色阳性表达面积百分比均显著升高($P < 0.01$),说明中、高剂量

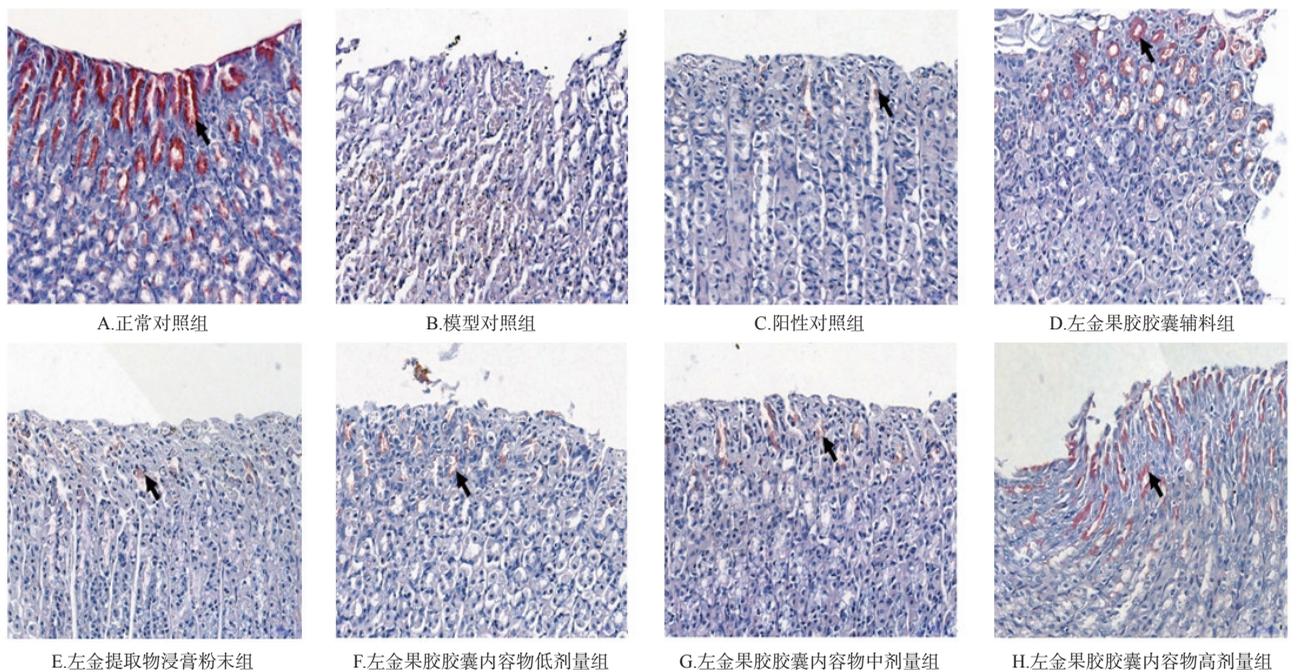


注：“↑”表示壁细胞变性坏死；“△”表示淋巴细胞；“□”表示中性粒细胞；“○”表示血管充血扩张

Note: “↑” indicates degeneration and necrosis of parietal cells; “△” indicates lymphocyte; “□” indicates neutrophils; “○” indicates hyperemia and dilation of blood vessels

图4 各组大鼠胃组织的HE染色显微图(×200)

Fig 4 Micrographs of HE staining of gastric tissue of rats in each group(×200)



注：“↑”表示PAS阳性表达

Note: “↑” indicates PAS positive expression

图5 各组大鼠胃组织的PAS染色显微图(×400)

Fig 5 Micrographs of PAS staining in gastric tissue of rats in each group(×400)

左金果胶胶囊内容物和辅料对提高胃组织中粘多糖含量的作用均强于阳性对照药物。

3 讨论

本课题组前期已对左金提取物浸膏粉末的制备条

件进行了摸索,确定了最佳的制备条件;此外,本课题组前期还基于谱-效关系对左金提取物抗胃溃疡的有效成分进行了研究,发现盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱和吴茱萸次碱在抗胃溃疡的作用中有显著贡献^[8]。由于

表7 各组大鼠胃组织PAS染色阳性表达面积百分比的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 7 Percentage of PAS positive expression area in gastric tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | PAS染色阳性表达面积百分比,% | 组别 | PAS染色阳性表达面积百分比,% |
|-----------|--------------------------|---------------|--------------------------|
| 正常对照组 | 3.20±0.23 | 左金提取物浸膏粉末组 | 0.89±0.08 ^{***} |
| 模型对照组 | 0** | 左金果胶胶囊内容物低剂量组 | 0.09±0.01 ^{##} |
| 阳性对照组 | 0.07±0.01 ^{##} | 左金果胶胶囊内容物中剂量组 | 1.05±0.15 ^{***} |
| 左金果胶胶囊辅料组 | 1.28±0.08 ^{***} | 左金果胶胶囊内容物高剂量组 | 1.89±0.30 ^{***} |

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型对照组比较,^{##} $P<0.01$;与阳性对照组比较,^{ΔΔ} $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model control group, ^{##} $P<0.01$; vs. positive control group, ^{ΔΔ} $P<0.01$

本研究是按照本课题组前期优化的条件制备的左金提取物浸膏粉末,此时左金提取物浸膏粉末中4种有效成分的含量已为最高,且由于该浸膏粉末易引湿、吸潮,与辅料混合后的流动性较差,因此本研究未以上述4种有效成分的含量作为考察指标,而是以颗粒剂的重要质量检查项目——成型性、吸湿性、流动性作为指标对左金果胶胶囊的处方进行优化。结果显示,按最优处方制备的左金果胶胶囊的颗粒的成型率高、吸湿率较低、流动性良好,且上述4种有效成分的含量较均一。

在体外释放实验中,笔者只检测到了左金果胶胶囊中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱这2种有效成分,而吴茱萸碱和吴茱萸次碱均未能检出。结合左金果胶胶囊中黄连提取物浸膏粉末与吴茱萸提取物浸膏粉末的质量差别大,以及吴茱萸碱和吴茱萸次碱脂溶性强、水溶性差的特点,笔者推测出现该结果的原因可能是由于吴茱萸碱和吴茱萸次碱在左金果胶胶囊中的含量过低以及二者在盐酸溶液中的溶解度过低共同造成的。通过拟合盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的释放方程,发现二者均符合零级释放行为,提示其具有缓释作用,能在一定程度上达到降低局部药物浓度过高、减少服用次数以增强患者顺应性的效果。

在考察左金果胶胶囊对乙醇所致大鼠胃溃疡的保护作用时,本研究选择含有果胶且同为胶囊剂的临床常用胃黏膜保护药——胶体果胶铋胶囊为阳性对照药物进行药效对比。实验除了设置常规的正常对照组、模型对照组、阳性对照组和受试药物组外,还另外设置了左金果胶胶囊辅料组和左金提取物浸膏粉末组,其目的是为了在考察左金果胶胶囊的胃保护作用的同时验证“药辅合一”的理念。结果显示,经乙醇诱导后模型大鼠的胃组织发生了明显的病理学变化,主要表现在胃黏膜严重出血性糜烂、黏膜下层水肿与酸性粘多糖含量显著降低等;而各给药组大鼠上述病理学变化均有不同程度改善。其中,左金果胶胶囊内容物高剂量组大鼠的胃溃疡抑制率约为76.63%,而左金果胶胶囊辅料组、左金提取物浸膏粉末组大鼠的胃溃疡抑制率分别约为37.35%、

61.91%,这提示左金果胶胶囊内容物抗胃溃疡的药效可能是由左金提取物浸膏粉与辅料协同贡献的。并且本研究发现,左金果胶胶囊内容物高剂量组的胃溃疡抑制率和阳性对照组相近。根据上述结果,笔者推测可能是果胶等辅料在胃内形成了高黏度溶胶,溶胶黏附于胃黏膜后增强了黏膜保护屏障,并延长了盐酸小檗碱等有效成分在胃内的滞留时间,从而共同协同发挥了胃保护作用。结果表明,将左金提取物浸膏粉末结合现代辅料所制备的左金果胶胶囊相较于传统左金丸有更好的胃溃疡保护作用,即体现出了“药辅合一”理念中辅料具有一定药理活性的观点^[17]。

综上所述,本研究以传统左金丸为原型,以左金提取物浸膏粉末为原料,以具有胶体性质和对胃黏膜有显著吸附效果的果胶为主要辅料,采用湿法制粒填充法制备了左金果胶胶囊并优化了其处方。该胶囊制备工艺简单、易于产业化,且其对乙醇所致大鼠胃溃疡具有显著的保护作用。

参考文献

- [1] BEIRANVAND M,BAHRAMIKIA S. Ameliorating and protective effects mesalazine on ethanol-induced gastric ulcers in experimental rats[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 888:173573.
- [2] XIE L, GUO Y L, CHEN Y R, et al. A potential drug combination of omeprazole and patchouli alcohol significantly normalizes oxidative stress and inflammatory responses against gastric ulcer in ethanol-induced rat model[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 85:106660.
- [3] WANG Y, SUN Y W, WANG Y M, et al. Virtual screening of active compounds from artemisiaargyi and potential targets against gastric ulcer based on network pharmacology [J]. Bioorg Chem, 2019, 88:102924.
- [4] 季晓杭.左金丸古今文献研究及临床应用探讨[D].南京:南京中医药大学,2017.
- [5] 姚晓艳,刘文,宋信莉,等.左金对乙醇诱导大鼠胃溃疡的治疗作用及机制研究[J].中华中医药学刊, 2019, 37(10):2404-2407.
- [6] 谢明勇,李精,聂少平,等.果胶研究与应用进展[J].中国食品学报, 2013, 13(8):1-14.
- [7] 李明泉,毕荣,刘娟,等.胶体果胶铋治疗慢性胃炎和消化性溃疡的临床观察[J].中国社区医师(医学专业半月刊), 2008, 10(4):32.
- [8] 姚晓艳.基于“谱-效关系”左金抗胃溃疡有效组分的研究[D].贵阳:贵州中医药大学,2019.
- [9] 杨颂,刘文,王群,等.左金胃漂浮缓释片多组分体外释放研究[J].时珍国医国药, 2013, 24(1):125-126.
- [10] 刘文,杨颂,王群,等.指纹图谱用于左金胃漂浮缓释片多组分体外释放的研究[J].中华中医药杂志, 2013, 28(11):3428-3430.
- [11] 刘学,邱红燕,彭静,等.咳清胶囊的质量标准提高研

基于NLRP3炎症小体活化探讨“三色散”挥发油减轻膝骨关节炎滑膜炎的机制[△]

廖太阳*,张力,张皞晟,李晓辰,吴鹏,王培民[#](南京中医药大学附属医院/江苏省中医院骨伤科,南京210029)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)19-2335-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.19.05



摘要 目的:基于NOD样受体家族3(NLRP3)炎症小体的活化探讨“三色散”挥发油减轻膝骨关节炎(KOA)滑膜炎的机制。方法:采取水蒸气蒸馏法提取“三色散”挥发油,采用气质联用(GC-MS)技术分析其组成。提取雄性SD大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞(FLS),采用CCK-8法检测10、25、50、100、250、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ “三色散”挥发油对FLS存活率的影响;以脂多糖诱导12 h建立KOA炎症细胞模型,检测10、250 $\mu\text{g/mL}$ “三色散”挥发油对炎症模型细胞中NLRP3、胱天蛋白酶1(caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的蛋白及其mRNA相对表达量的影响,检测炎症模型细胞上清液中白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-18水平。结果:提取得到黄色澄清且有独特芳香气味的“三色散”挥发油0.51~0.61 g,提取率为0.33%~0.41%($n=9$)。从该挥发油中共分离得到化学成分41种,鉴定了其中的30种,其峰面积之和占总峰面积的90.073 6%;相对含量较高的成分依次为芳姜黄酮(17.573 9%)、 δ -杜松烯(15.434 5%)、姜黄酮(11.509 5%)等。当“三色散”挥发油质量浓度为10~250 $\mu\text{g/mL}$ 时,其对FLS存活率均无显著影响($P>0.05$)。与空白组比较,模型组细胞中NLRP3、caspase-1、ASC的蛋白及其mRNA相对表达量以及细胞上清液中IL-1 β 、IL-18水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,“三色散”挥发油10、250 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞及上清液中上述指标的相对表达量或水平均显著降低($P<0.05$)。结论:“三色散”挥发油可能通过抑制FLS中NLRP3炎症小体的活化而减少下游炎症级联反应,从而发挥其改善KOA滑膜炎的作用。

关键词 膝骨关节炎;滑膜炎;NOD样受体家族3炎症小体;三色散;挥发油;成纤维样滑膜细胞

Discussion on the Mechanism of Synovitis of KOA Relieved by “Sanse Powder” Volatile Oil Based on the Activation of NLRP3 Inflammasome

LIAO Taiyang, ZHANG Li, ZHANG Haosheng, LI Xiaochen, WU Peng, WANG Peimin (Dept. of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To discuss the mechanism of synovitis of knee osteoarthritis (KOA) relieved by “Sanse powder” volatile oil based on the activation of Nod-like receptor family 3 (NLRP3) inflammasome. METHODS: “Sanse powder” volatile oil was extracted by distillation-condensation process and the components of it were analyzed by GC-MS. Fibroblast-like synovial cells (FLS) were extracted from the knee joint of male SD rats. The effects of 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000 $\mu\text{g/mL}$ “Sanse

- 究[J].中国药房,2020,31(5):595-600.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:6-7,132-137,145-147,480-483.
- [13] 王科,叶花,王鹏飞,等.参草宁心颗粒干法制粒处方筛选及工艺参数优化[J].中国中医药信息杂志,2019,26(11):74-78.
- [14] 温慧敏,尹小娟,杨沙,等.小儿伤科泡腾颗粒剂的制备及
[△]基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81774334);江苏省中医药领军人才培养项目(No.SLJ0207)
* 硕士研究生.研究方向:膝骨关节炎的基础与临床. E-mail: drtaiyang@126.com
[#] 通信作者:主任中医师,教授,博士生导师,博士.研究方向:膝骨关节炎的基础与临床.电话:025-86617141. E-mail: drwpm@163.com
- 处方优化[J].中国医院用药评价与分析,2019,19(11):1303-1305.
- [15] 余巧,李大炜,徐英辉,等.香连胃漂浮片的制备及体外释放研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(5):561-565.
- [16] ZHANG C, GAO F, GAN S, et al. Chemical characterization and gastroprotective effect of an isolated polysaccharide fraction from *Bletilla striata* against ethanol-induced acute gastric ulcer[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 131: 110539.
- [17] 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:2021-04-07 修回日期:2021-08-15)
(编辑:林静)