

龙血竭凝胶剂的制备及对创面组织的修复作用

石聪^{1,2}, 张兰春¹, 余晓玲³, 于浩飞^{1*}, 胡炜彦¹, 赵荣华⁴, 高秀丽⁵, 张荣平^{1,3*}

(1. 昆明医科大学, 昆明 650500; 2. 保定市第一中心医院, 河北保定 071000;
3. 昆明市中医医院, 昆明 650011; 4. 云南中医学院南药研究协同创新中心, 昆明 650500;
5. 贵阳医学院药学院, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**研究龙血竭凝胶剂的制备工艺,并评价其创面组织修复作用。**方法:**采用正交试验,以卡波姆、丙二醇、pH值为考察因素,以凝胶剂的外观、刺激性、酸碱度、耐热、耐寒和加速离心实验为考查指标,筛选凝胶剂最佳基质处方;小鼠创面组织修复实验,30只昆明种小鼠,随机分为3组:模型组、龙血竭凝胶剂组、克林霉素利多卡因凝胶剂组,在小鼠背部切取直径为1.2 cm的创伤动物模型,以龙血竭凝胶剂为实验组,克林霉素利多卡因凝胶剂为阳性组,凝胶剂基质为模型组处理创伤动物模型,在不同时间点观察创面愈合情况,并对创面病理切片进行组织病理学评分。**结果:**优选处方为卡波姆-940 0.5%,丙二醇 2.5 mL,pH 8.0。小鼠创伤模型涂抹克林霉素利多卡因凝胶剂和龙血竭凝胶剂,创面无感染,愈合面光滑平整;比较创伤修复结果,龙血竭凝胶剂与克林霉素利多卡因凝胶剂较模型组创面愈合时间显著缩短,具有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:**该凝胶剂处方和制备工艺稳定可行,凝胶剂外观颜色均匀,涂布性能良好,耐寒耐热试验均无变化,龙血竭凝胶剂对小鼠创伤模型具有明显组织修复作用。

[关键词] 龙血竭; 凝胶剂; 正交试验; 组织修复

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0156-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020156

Preparation and Wound Tissue Repair Action of Dragon's Blood Gel SHI Cong^{1,2}, ZHANG Lan-chun¹, YU Xiao-ling³, YU Hao-fei^{1*}, HU Wei-yan¹, ZHAO Rong-hua⁴, GAO Xiu-li⁵, ZHANG Rong-ping^{1,3*}

(1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Baoding No. 1 Central Hospital, Baoding 071000, China; 3. Kunming Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650011, China; 4. Southern Pharmaceutical Research Collaborative Innovation Center, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 5. School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare the dragon's blood gels and to investigate its effect of wound tissue repair in mice. **Method:** The orthogonal experiment was designed with carbomer concentration, propylene glycol volume and pH value as factors, the appearance, irritation, thermostability, chill stability and centrifug stability as evaluation index to optimize the best formula of dragon's blood gels. Thirty mice were randomly divided into 3 groups, the model group (gels base), the observation group (dragon's blood gels) and the positive drug group (clindamycin lidocaine gels). The trauma was made by cutting a size of the diameter of 1.2 cm wound in the back of the mice. The wound changes at different time points were observed and the histopathological score of wound biopsy was evaluated. **Result:** The preparation of dragon's blood gel was optimized as follows: 0.5% Carbomer-940, 2.5 mL Propylene glycol and adjusting pH to 8.0. The product displayed a predominant spread property with uniform appearance and color. No changes of product were observed after the thermostability, chill stability and eentrifug stabiity tests. The mice tests showed that the wound surface was more smooth and neat, and the heal time

[收稿日期] 20140624(021)

[基金项目] 云南省高校协同创新中心-南药研究协同中心项目(NY2014002);云南省教育厅科学研究基金重大专项(ZD2012004)

[第一作者] 石聪, 硕士, 药师, 从事药房工作, Tel:15127234796, E-mail: shicong_go@163.com

[通讯作者] *张荣平, 教授, 博士生导师, 从事中药药效学研究, Tel:0871-65922812, E-mail: zhrpkm@163.com;
于浩飞, 硕士, 实验师, 从事中药活性成分研究, Tel:0871-65922812, E-mail: yufei5322032@163.com

was shorter in the dragon's blood gels and positive drug groups than those in the model group with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** The preparation technology of dragon's blood gels is simple and the gel has good stability. Moreover, the dragon's blood gels could promote the tissue repair in mice.

[**Key words**] dragon's blood; gels; orthogonal test; tissue repair

龙血竭 (Resina Draconis) 又名麒麟竭, 始于《唐本草》, 为剑叶龙血树树干产生的红色树脂, 性甘、温、咸、平, 归心、肝经, 具有活血化瘀、消肿止痛、止血补血、敛疮生肌的药理功效, 被称为“活血之圣药”^[1], 中医常用作活血散瘀和止血药。主要用于外伤出血、溃疡不敛、跌打损伤等, 广泛应用于膏、丸、丹、散、片及喷雾剂中成药产品中。临床应用龙血竭治疗难愈性创面, 具有良好的疗效。凝胶剂作为一种新型制剂, 具有局部作用快, 药物易吸收, 透气性好, 具有很好的生物相容性, 可长时间作用于患处, 可发挥缓控释作用的特点^[2]。临床上使用龙血竭散剂治疗难愈性创面, 治疗效果明显。龙血竭是传统名贵中药材, 针对临床龙血竭中药散剂药物资源浪费严重、治疗效果差的现象, 本实验充分结合药物和凝胶剂的特点, 将龙血竭制成凝胶剂, 采用传统正交试验法筛选凝胶剂基质, 从外观性状和质量标准考察选择凝胶剂制备工艺, 将龙血竭凝胶剂用于小鼠创面模型, 通过小鼠创面愈合率、小鼠创面结痂、脱痂时间及愈合时间对龙血竭凝胶剂进行药理评价。通过探讨龙血竭促进创面愈合的药理学机制, 结合凝胶剂易于人体吸收的特点, 充分发挥龙血竭的药理作用, 不仅方便临床使用, 效果显著, 而且大大提高了龙血竭药物资源利用率, 使中药凝胶剂成为现在开发研究的新方向。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠 40 只, 雌雄各半, SPF 级,

表 1 龙血竭凝胶剂基质筛选的评分标准

Table 1 Scoring criteria of Longxuejie gel screening matrix

指标/2.5 分	分值			
	优/2.0 ~ 2.5	良/1.0 ~ 1.9	可/0.4 ~ 0.9	差/0 ~ 0.3
光泽度	表面光滑呈棕红色	表面平整有光泽	表面棕红色, 无光泽	表面颗粒明显且无光泽
涂展性	易于涂抹	可涂布无细腻感	可涂开, 涂布性差	结块, 不宜涂抹
均匀度	细腻无颗粒感	较细腻	较粗糙, 有颗粒感	粗糙, 粒感明显
离心度	外观均匀无变化	无分层现象	分层	分层明显

2.2 单因素考察

2.2.1 丙二醇用量考察 将固定量龙血竭粉末溶于丙二醇, 丙二醇的用量分别为 10.0, 12.0, 15.0, 18.0, 20.0 mL, 充分搅拌混合, 15 min 后观察, 溶剂

体重 22 ~ 25 g, 购于昆明医科大学实验动物学部, 合格证号 SCXK(滇)2009-3-006。

1.2 药物及试剂 龙血竭(西双版纳雨林药业有限公司生产, 批号 070905), 克林霉素利多卡因凝胶剂(上海新亚药业闵行有限公司, 批号 H31022635), 实验所用试剂均为分析纯, 实验用水为纯净水。

1.3 仪器 BS224S 型电子分析天平(上海机电设备有限公司), RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣有限公司), TDL-80-2B 型高速台式离心机(上海沪誉仪器有限公司)。

2 方法及结果

2.1 龙血竭凝胶剂的制备

2.1.1 空白基质筛选 为使药物在载体基质中均匀分布, 分别取处方量卡波姆、海藻酸盐、羧甲基纤维素钠和明胶, 加适量蒸馏水, 充分搅拌溶胀, 作为凝胶剂载体, 分别加入龙血竭药物混合, 静置 2 h 后观察, 卡波姆作为载体基质无分层、结块、药物析出等现象出现, 且凝胶剂成型性好、性质稳定。

2.1.2 凝胶剂制法 取处方量卡波姆, 溶于适量蒸馏水中, 充分搅拌, 使其溶胀。另取处方量的丙二醇、聚山梨酯-80, 搅拌下加入龙血竭粉末, 药物充分溶解后加入到凝胶基质中, 适量三乙醇胺调节 pH, 即得凝胶剂。

2.1.3 评分标准 按照以下评分标准对凝胶剂做出综合评分, 满分 10 分。见表 1。

体积为 15.0 mL 时将药物充分溶解, 进行皮肤测试, 无颗粒感、无刺激、润滑性较好。

2.2.2 卡波姆浓度选择 按 2.1.2 项方法, 平行制备 5 份凝胶, 卡波姆质量分数分别为 0.4%, 0.5%,

0.6% , 0.7% , 0.8% 。静止放置 2 h , 按 2.1.3 项对凝胶剂进行评分, 综合评分结果见表 2。调节卡波姆不同浓度, 通过静置观察, 质量分数为 0.6% 时, 光泽度、涂展性、均匀度、颗粒度都符合凝胶剂质量要求。

表 2 不同浓度卡波姆基质的综合评分
Table 2 Composite score of different concentrations of carbomer matrix

卡波姆 质量分数 /%	光泽度	涂展性	均匀度	颗粒度	综合评分 /points
0.4	2.0	1.6	1.8	1.8	7.2
0.5	2.2	1.8	2.0	2.0	8.0
0.6	2.3	2.3	2.4	2.5	9.5
0.7	1.9	1.5	1.6	1.8	6.8
0.8	1.8	1.4	1.6	1.9	6.7

2.2.3 对 pH 的影响 基质质量、药物质量和丙二醇的体积作为恒定量, 三乙醇胺调节凝胶剂 pH, 按 2.1.3 项进行评分, 综合评分结果见表 3。调节凝胶剂为不同 pH 值, 通过静置观察及皮肤测试, pH 8.0 时成形性、稳定性和涂展性都符合凝胶剂质量要求, 且对创面皮肤无刺激性。

表 3 龙血竭凝胶不同 pH 综合评分
Table 3 Different pH composite score of Longxuejie gel

pH	光泽度	涂展性	均匀度	离心度	综合评分 /points
6.0	0.8	1.5	1.0	0.2	3.5
7.0	1.5	1.5	1.5	2.0	6.5
7.5	1.5	2.0	1.5	2.0	7.0
8.0	2.0	2.0	2.0	2.2	8.2
9.0	1.5	1.5	1.5	2.0	6.5

2.3 龙血竭凝胶工艺制作正交试验 根据单因素实验考察结果表明, 对凝胶剂的成型性影响较大的因素分别为卡波姆浓度、丙二醇体积和 pH, 各个因素之间的作用关系复杂。为了筛选最佳处方, 采用正交试验进一步优化制备工艺, 以外观质量和制剂稳定性作为综合评分考察指标, 考察影响成型性的 3 个主要因素: 卡波姆凝胶浓度 (A)、丙二醇体积 (B)、酸碱度 (C), 每个因素选择 3 个水平, 按 $L_9(3^3)$ 安排正交试验, 因素水平见表 4。按表 4 中各个因素和水平条件制备凝胶剂, 每个实验条件平行重复 3 次, 分别对凝胶剂光泽度、涂展性、均匀性和离心性进行综合评分。正交试验结果见表 5, 方差分析结果见表 6。由方差分析结果可以看出, $P <$

0.05 具有统计学意义。综合考虑各个因素的影响, 故选择卡波姆凝胶质量分数为 0.5%, 丙二醇为 2.5 mL, pH 8.0。优化工艺路线为 $A_1B_3C_3$ 。

表 4 因素水平

Table 4 Level of factor

水平	A 卡波姆凝胶/%	B 丙二醇/mL	C pH
1	0.5	1.5	7.0
2	0.6	2.0	7.5
3	0.7	2.5	8.0

表 5 处方优选正交试验分析

Table 5 Prescription based on orthogonal experiment

序号	A	B	C	D	综合评分 /points
1	1	1	1	1	7.41
2	1	2	2	2	8.46
3	1	3	3	3	8.56
4	2	1	2	3	7.13
5	2	2	3	1	7.86
6	2	3	1	2	8.26
7	3	1	3	2	6.61
8	3	2	1	3	6.41
9	3	3	2	1	6.59

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	4.208	2	2.429	5.140	<0.05
B	0.858	2	0.495	5.140	<0.05
C	0.132	2	0.076	5.140	<0.05
D(误差)	0.503	2			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

2.4 质量评价试验

2.4.1 刺激性试验^[3] 考察凝胶剂对皮肤、黏膜有无刺激性或致敏作用, 采用刺激性试验方法在人体皮肤上进行实验。将凝胶剂涂抹在人体的手臂、大腿内侧皮肤上, 24 h 后观察, 皮肤无发红、起泡、充血或其他过敏现象。

2.4.2 酸碱度 为了避免凝胶剂在制作过程中被酸或碱性试剂处理后, 对皮肤造成刺激, 将凝胶剂加适量乙醇溶解, 所得溶液用 pH 计测定酸碱度为 6.8, 符合制剂酸碱度要求。

2.4.3 离心试验^[4] 取凝胶剂 3 批, 每批各 10 g 置离心管中, 以 $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 30 min 后取出, 凝胶剂无分层现象。

2.4.4 耐热试验 取凝胶剂 3 批,各批 10 g 置具玻璃瓶中,55 ℃ 水浴放置 2 h,凝胶剂无分层现象及颜色的变化。

2.4.5 耐寒试验 取凝胶剂 3 批,每批各 10 g 置玻璃瓶中,-18 ℃ 放置 72 h,凝胶剂无分层现象及颜色变化。

3 动物实验

3.1 小鼠创面组织修复实验方法 选用 30 只小鼠,随机分为 3 组,ip 戊巴比妥钠 40 μg·g⁻¹ 麻醉,在背部切取直径为 1.2 cm 大小的皮肤,深及筋膜肌肉,3 组分别为模型组、龙血竭凝胶剂组、克林霉素利多卡因凝胶剂组。模型组外涂凝胶剂基质,受试药组外涂龙血竭凝胶剂,阳性组外涂克林霉素利多卡因凝胶剂。分别于术后 1,3,6,9,12 d 对每组的小鼠进行创伤面积数码采集,采用数码照相的方法记录用药后 3,6,9,12 d 的伤口面积,使用图像软件分析创面面积^[5]。计算创面皮肤愈合率,开始结

痂、脱痂天数和愈合天数作为结果评价受试药物的作用。末次用药后次日监测大鼠血样,然后脱颈处死,剪取创伤部位皮肤,固定于 10% 甲醛溶液中,石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜下观察比较各组小鼠烫伤皮肤的表皮修复、真皮胶原纤维束修复、真皮毛囊增生、真皮及皮下组织炎症细胞浸润的愈合程度。

3.2 对创面组织修复的影响 不同药物组实验结果显示,模型组小鼠创伤部位恢复时间最长,愈合速度慢,伤口处结痂和脱痂时间较其他两组晚;与模型组比较,克林霉素利多卡因凝胶剂组小鼠伤口愈合速度快,创伤面易恢复,脱痂时间快但是结痂时间较龙血竭凝胶剂组慢($P < 0.05$)。龙血竭凝胶剂组在用药初期伤口愈合速度最快,但创伤面积减少率较克林霉素利多卡因凝胶剂组小,创面愈合时间较长($P < 0.05$)。各组创伤面积减少率结果见表 7,小鼠创面结痂、脱痂及愈合时间见表 8。

表 7 龙血竭凝胶剂对小鼠创伤面积减少率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effects of the dragon's blood gels on reduction rate of experimental wound area($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	原始创伤面积 /mm ²	用药后不同时间创伤面积减少率/%			
		3 d	6 d	9 d	12 d
模型	49.08 ± 0.03	29.70 ± 0.04	54.07 ± 0.06	65.87 ± 0.05	78.95 ± 0.08
龙血竭凝胶剂	43.64 ± 0.02	36.36 ± 0.05	53.98 ± 0.04	72.99 ± 0.07	89.65 ± 0.06
克林霉素利多卡因凝胶剂	55.09 ± 0.04	33.93 ± 0.03	57.45 ± 0.04	85.39 ± 0.04	92.32 ± 0.08

表 8 龙血竭凝胶剂对结痂、脱痂和愈合时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effects of the dragon's blood gels on time of scab, scab and healing($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	时间/d		
	结痂	脱痂	愈合
模型	5.00 ± 1.00	10.3 ± 1.5	18.5 ± 4.0
龙血竭凝胶剂	2.65 ± 0.65	9.0 ± 3.0 ¹⁾	17.2 ± 2.5 ¹⁾
克林霉素利多卡因凝胶剂	2.75 ± 0.75	9.0 ± 1.0 ¹⁾	16.7 ± 3.5 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 组织病理学评分结果^[6] 小鼠创面病理切片组织病理学评分准则见表 9,模型组的表皮结构、胶原纤维束及粒细胞浸润的综合评分较低,与模型组相比,龙血竭凝胶剂组和克林霉素利多卡因凝胶剂组的表皮结构、胶原纤维束及粒细胞浸润的综合评分明显升高($P < 0.05$),见表 10。龙血竭凝胶剂对受损皮肤有较好的修复作用,结痂时间和创面愈合速度作用较快。

表 9 评分准则

Table 9 Criteria of rating

项目	评分		
	0 分	1 分	2 分
表皮结构	完全破坏/缺乏	部分坏死	正常
胶原纤维束	无定行胶原纤维束被破坏	水肿,胶原纤维束紊乱	正常
粒细胞浸润	>16	6~15	<5

表 10 龙血竭凝胶剂对小鼠创面的影响综合评分($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 10 Composite score of effect of Longxuejie gel on mouse wound($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	表皮结构	胶原纤维束	粒细胞浸润
模型	0.6 ± 0.15	0.6 ± 0.46	0.9 ± 0.30
龙血竭凝胶剂	1.3 ± 0.45 ¹⁾	1.0 ± 0.80 ¹⁾	1.3 ± 0.90 ¹⁾
克林霉素利多卡因凝胶剂	1.5 ± 0.63 ¹⁾	1.3 ± 0.58 ¹⁾	1.9 ± 0.78 ¹⁾

4 讨论

在凝胶剂工艺制作处方筛选实验过程中,基质

的选择对凝胶剂的流变学性质及释药性有重要影响,不仅要求有基质具有良好的溶胀性能,而且有一定的塑性流变学性质。经多次实验,选择出具有良好的涂展性、均匀性和挤出性能的凝胶剂处方配比。针对传统剂龙血竭散剂用量大,治愈效果差的现象,凝胶剂将充分发挥龙血竭的药理作用。外科用凝胶剂不经口服或注射而起到全身性作用,从而减少因口服或注射用药产生的多种副作用是一种极具潜力的外用剂型,不仅可以避免药物在胃肠道中被酸、消化酶的首过消除作用,而且可以减轻药物对机体的毒副反应,符合中医的“内病外治”的传统理念^[7]。在选择凝胶剂载体基质时不能忽视载体基质本身的酸碱度对药物和皮肤黏膜的影响,质量需符合国家药典规定标准^[8]。实验中选择卡波姆为载体基质材料,对皮肤和机体无任何刺激性,水溶性基质对皮肤有较好的亲和力,药物易释放,机体吸收快,而且具有易涂抹、不易污染衣物的优点。载体基质能够自动降解,绿色环保,广泛用于化妆品的研制中,是一种很有前途的药用辅料,凝胶剂成型性好、性质稳定涂敷后皮肤感觉舒适^[9]。小鼠创伤实验表明,本制剂创面组织修复作用较强,愈合速度快,结痂时间相对较短在创伤部位对于毛囊或者是真皮部位修复作用较强,在治疗创伤的同时有抗氧化作用,能够激活白细胞,改善机体免疫功能,增强创伤部位的免疫能力,加速创面愈合速度^[10]。在此次试验中发现龙血竭凝胶剂具有促进小鼠毛发生长的作用,可能是由于龙血竭具止血活血的药用功效,扩张血管,改善微循环,给毛囊球部位带来更多的营养成分,带走诸多的毒性代谢产物。龙血竭本身具有祛腐生肌促进创面愈合的药理作用相吻合,能使创口感染率降低,减少创伤初期局部渗出。在开放性创口中由于皮肤表面的保护层被破坏,细菌容易侵入使得伤口处容易造成感染,所以在创面保持不被感染的情况下同时对伤口具有收敛作用减小创伤面积^[11]。中药制剂药理作用较多,治疗范围广泛,副作用小成为现在

临床选择用药的主要原因之一。抗生素类化学药品虽然对创伤等疾病具有较好的治疗作用,但是长期使用抗生素类药品会造成人体对细菌具有耐受性。中药凝胶剂不仅对于开放性创伤有效,而且闭合性伤口易于透过皮肤发挥活血作用,能够使皮肤下的瘀血快速散开,伤口愈合速度加快,副作用小。将凝胶剂和传统中药相结合成为现代中药凝胶剂开发研究的新方向。

[参考文献]

- [1] 陈定芳,宋启示. 血竭资源开发的研究进展[J]. 广州中医药大学学报,2004,21(6):489-490.
- [2] 张宁,徐艳明,祁永华,等. 外用凝胶剂研究进展[J]. 黑龙江医药,2010,23(10):93-93.
- [3] 董得时,陈艳伟,汤新强,等. 正交试验优选姜油树脂凝胶的处方[J]. 大连医科大学学报,2009,31(3):335-336.
- [4] 马卓,沈雄,陈钱锋,等. 中药透皮吸收制剂的研究进展[J]. 中药材,2005,28(12):1136-1138.
- [5] 马恩龙,李艳春,甘乐凌,等. 创伤灵膏对实验性烧烫伤的治疗作用[J]. 中药药理与临床,2004,20(2):36-38.
- [6] 罗琼,汪建平,阮金兰,等. 豨莶草促进皮肤创伤愈合的实验研究[J]. 医药导报,2008,27(10):1161-1163.
- [7] 马卓,沈雄,陈钱锋,等. 中药透皮吸收制剂的研究进展[J]. 中药材,2005,28(12):1136-1138.
- [8] Lanmorris George Varughese. 秋水仙碱治疗急性痛风[J]. 英国医学杂志,2004,7(2):121-121.
- [9] 王朝,黄绳武. 凝胶剂研究进展[J]. 医药导报,2009,29(12):223-226.
- [10] 吴巧云,吴贤杰,吕中法,等. 红花和当归等中药煎剂对体外培养的鼠毛囊毛发生长与毛球部细胞增殖的影响[J]. 浙江大学学报,2006,35(4):435-439.
- [11] 张连阳,姚元章. 严重创伤的早期救治[J]. 中国实用外科杂志,2008,28(7):582-584.

[责任编辑 周冰冰]