

基于药效学评价的烧伤愈合水凝胶制备工艺优化 及其药效成分的含量测定

陈永刚¹, 李丽姣², 邹吉利¹, 陈敏^{1*}, 何晶²

(1. 武汉市第三医院, 武汉 430060; 2. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] 目的:利用药效学指标优选烧伤愈合水凝胶的制备工艺,结合药效成分含量测定进行再评价。方法:采用不同工艺方法制备水凝胶,利用大鼠烫伤模型,观察各工艺制剂对创面组织病理结构改善及创面面积愈合情况的影响,测定治疗后大鼠血清肿瘤坏死因子- α ,白细胞介素- 1β 和髓过氧化物酶水平。利用高效液相色谱法和气相色谱法分别测定最佳工艺水凝胶与原工艺愈合膏中主要化学成分的含量。结果:治疗21 d后,烧伤愈合膏组、半提取水凝胶组和湿润烧伤膏组大鼠烫伤创面面积分别为 (0.28 ± 0.15) , (0.31 ± 0.36) , (0.29 ± 0.17) cm^2 ,愈合情况均良好。但半提取水凝胶组对减轻炎性细胞浸润程度、降低3个炎症因子含量的作用优于原剂型烧伤愈合膏组,与湿润烧伤膏组结果较接近。水凝胶中3种生物碱成分盐酸小檗碱、盐酸巴马汀及盐酸黄连碱含量均值分别为1.609, 0.247, 0.335 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,均高于同批次愈合膏中相应成分的含量;水凝胶中 α -蒎烯、柠檬烯、异龙脑及龙脑质量分数分别为0.052, 0.149, 1.438, 1.643 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,均高于同批次愈合膏中相应成分的含量。结论:采用最佳工艺制备的水凝胶除了创面愈合面积稍小于原工艺外,其余药效学指标均优于原工艺,且药效成分的含量更高,更适用于烧伤创面的治疗。

[关键词] 烧伤愈合水凝胶; 烧伤愈合膏; 药效学指标; 生物碱; α -蒎烯; 柠檬烯; 异龙脑

[中图分类号] R283.6; S481+.9; R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0010-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016110010

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160415.1010.016.html>

[网络出版时间] 2016-04-15 10:10

Optimization of Preparation Process of Shaoshang Yuhe Hydrogel Based on Pharmacodynamic Evaluation and Determination of Its Effective Ingredients

CHEN Yong-gang¹, LI Li-jiao², ZOU Ji-li¹, CHEN Min^{1*}, HE Jing²

(1. Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China;

2. Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation process of Shaoshang Yuhe hydrogel based on its pharmacodynamic index and determine the content of major pharmacological compositions in this preparation. **Method:** Hydrogels were prepared by different process, and the scald model in rats were used to evaluate efficacy by observing improvement of pathological structural and healing in wound area, measuring the levels of serum tumor necrosis factor- α , interleukin- 1β and myeloperoxidase. HPLC and GC were utilized to measure the content of major pharmacological compositions in hydrogel and cream with the original process, respectively. **Result:** After treatment of 21 d, the wound areas of rats in Shaoshang Yuhe cream group, half extracted hydrogel group and Shirun Shaoshang cream group were (0.28 ± 0.15) , (0.31 ± 0.36) , (0.29 ± 0.17) cm^2 , respectively. While effects of half extracted hydrogel group was better than Shaoshang Yuhe cream on reducing the infiltration degree of

[收稿日期] 20150713(015)

[基金项目] 武汉市人力资源与社会保障局关键技术攻关计划项目(2013060602010264)

[第一作者] 陈永刚, 博士, 副主任中药师, 从事中药资源开发利用与新药研究, E-mail: eyg508@163.com

[通讯作者] * 陈敏, 主管药师, 从事医院制剂研发工作, E-mail: 1002293577@qq.com

inflammatory cell and decreasing the content of three inflammatory factors, and it was closed to the Shirun Shaoshang cream group. The contents of three alkaloids as berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and coptisine hydrochloride in the hydrogel were 1.609, 0.247, 0.335 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, there were higher than these in Shaoshang Yuhe cream. The contents of four volatile components as α -pinene, limonene, isoborneol and borneol were 0.052, 0.149, 1.438, 1.643 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, there were higher than these in the same batch of Shaoshang Yuhe cream. **Conclusion:** In addition to wound healing area, other pharmacodynamic indexes and the contents of effective components of the hydrogel by the optimized preparation process are better than the cream.

[Key words] Shaoshang Yuhe hydrogel; Shaoshang Yuhe cream; pharmacodynamic index; alkaloids; α -pinene; limonene; isoborneol

血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-1 β (IL-1 β) 及髓过氧化物酶 (MPO) 被证实参与了烧伤后的系列炎症反应过程, 前两者是烧伤早期最重要促进炎症反应的细胞因子, 大量释放时可放大炎症反应^[1-5]; 后者具有产生和调节机体炎症反应作用^[6]。烧伤愈合膏是武汉市第三医院烧伤科基于“湿性医疗技术^[7]”, 结合长期临床经验研制出的一种油性软膏剂型的医院制剂 [批准文号鄂药制字 (2001) 第 BZ02-047], 方中以黄连为君药, 乳香、没药为臣药, 煅石膏、赤石脂、炉甘石、枯矾为佐药, 冰片为使药, 治疗深二度及以上烧伤, 尤其是促进创面愈合有独特疗效^[8]。前期已建立了该制剂中药效成分含量测定方法及其 HPLC 指纹图谱, 确定了软膏剂中主要色谱峰的归属; 利用深二度烧伤大鼠模型, 建立了 3 种生物碱成分在动物体内的药动学拟合模型, 预试验显示水凝胶剂的药动学各项参数与软膏剂性能差异较大, 具有增强疗效的可能。

亲水凝胶剂作为“湿性医疗技术”中一种新剂型, 具有易涂布、不污染衣物、易吸收、保持创面湿性环境的优点, 已被广泛用于治疗烧伤^[9-11]。本实验拟针对方中药味质地特点进行不同处理, 将原软膏剂型改为亲水凝胶剂。通过测定烧伤创面面积观察创面组织改善情况; 检测 TNF- α , IL-1 β , MPO 水平及制剂中主要化学成分含量, 考察烧伤愈合水凝胶促进大鼠深二度烧伤创面愈合的疗效, 综合评价该水凝胶的最佳制备方法。

1 材料

YLS-5Q 型数字式可控温-电烫仪 (上海复旦华富科技有限公司), RT-2100C 型酶标仪和 GF-W3000 型酶标洗板机 (山东高密彩虹分析仪器有限公司), EG 1150H 型生物组织包埋机和 RM 2016 型切片机 (德国徕卡公司), IXUS310HS 型数码相机 (日本佳能公司), LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日

本岛津公司), BT-25 型电子天平 (德国赛得利斯公司), GC6890N 型气相色谱仪和火焰离子化检测仪 (美国安捷伦公司), L-200 型氢气发生器 (郑州朋来仪器有限公司)。

盐酸黄连碱对照品 (成都曼斯特生物科技有限公司, 批号 MUST-12032301), 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、柠檬烯、龙脑、异龙脑和 α -蒎烯对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110713-200911, 110732-201108, 110726-200835, 110881-201107, 1512-200201, 110897-200502), TNF- α 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒和 IL-1 β ELISA 试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司), 人 MPO 酶联免疫试剂盒 (南京建成生物科技有限公司), 湿润烧伤膏 (汕头市美宝制药有限公司), 烧伤愈合膏、烧伤愈合水凝胶均为实验室自制; 乳香、没药等药材均由武汉市第三医院中药房提供, 经该院药学部孟军华副主任中药师鉴定均符合 2015 年版《中国药典》一部各药材项下规定。乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯。

清洁级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 200 ~ 250 g, 由湖北省实验动物研究中心提供, 合格证号 SCXK (鄂) 2010-0009。实验前动物置于室内适应环境 1 周, 室温 18 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 方法

2.1 烧伤愈合膏的制备 取处方量煅石膏、赤石脂、炉甘石、枯矾、乳香、没药、黄连粉碎成细粉, 混匀; 冰片研磨后加入上述药材细粉中, 均匀混合。称取药材粉末约 28 g [煅石膏-赤石脂-炉甘石-乳香-没药-黄连-枯矾-冰片 (8:8:8:1:1:1:0.8:0.8), 下文中药材用量均按此剂量比称取], 分别加入凡士林、羊毛脂、石蜡油, 搅拌均匀使成 100 g, 即得。为方便比较和计算, 下述试验均以 100 g 为 1 个制剂单位。

2.2 不同工艺水凝胶的制备

2.2.1 水凝胶空白基质^[12] 称取黄耆树胶粉 6 g, 均匀撒布于适量水面上, 静置过夜使充分溶胀, 分别加入水及乙二胺适量, 搅匀使成 100 g 空白凝胶。

2.2.2 全提取法水凝胶制备 取黄连, 加入 0.01% 盐酸水溶液 100 mL, 煎煮 30 min, 滤过, 滤液浓缩至适量(溶液 1); 取乳香、没药混合, 置挥发油提取器中, 加入水 100 mL 提取 2 h, 收集挥发油, 将冰片用适量 95% 乙醇溶解后加入挥发油中, 混合均匀, 另器保存(溶液 2)。将上述黄连、乳香、没药药渣置烧杯中, 加入煅石膏、炉甘石、赤石脂、枯矾等药味, 加水 300 mL, 煎煮 45 min, 滤过, 滤液浓缩至适量(溶液 3)。取黄耆树胶粉 6 g 均匀撒布于水溶液中, 静置过夜, 依次加入上述溶液 1, 2, 3, 加水与乙二胺适量, 混匀使成 100 g 水凝胶。

2.2.3 半提取法水凝胶 取煅石膏、炉甘石、赤石脂等药材, 粉碎成细粉, 其余药材按 2.2.2 项下溶液 1 和溶液 2 制备方法制备。取黄耆树胶粉 6 g 均匀撒布于水溶液中, 静置过夜, 依次加入溶液 1, 2 和药材细粉, 加水及乙二胺适量, 混匀使成 100 g 水凝胶。

2.2.4 不含矿物质水凝胶 除去方中煅石膏、炉甘石、赤石脂、枯矾 4 味矿物质药, 其余药材按 2.2.2 项下方法制备成 100 g 不含矿物质水凝胶。

2.2.5 只含矿物质水凝胶 取煅石膏、炉甘石、赤石脂、枯矾 4 味药, 粉碎成细粉, 混均。取黄耆树胶粉 6 g 均匀撒布于水溶液中, 静置过夜, 加入上述药材细粉, 加水及乙二胺适量, 混匀使成 100 g 水凝胶。

2.3 不同工艺制剂对烫伤大鼠模型的影响

2.3.1 大鼠分组、造模及给药 将 90 只大鼠随机分为 9 组, 每组 10 只, 分别为正常组、模型组、空白水凝胶组、只含矿物质水凝胶组、不含矿物质水凝胶组、烧伤愈合膏组、半提取水凝胶组、全提取水凝胶组、湿润烧伤膏阳性药组。将大鼠背部脱毛, 脱毛面积约 4 cm × 5 cm, 脱毛 24 h 后, 按 0.75 mg · kg⁻¹ 给予乌拉坦溶液将大鼠麻醉, 固定, 采用数字式可控温电烫仪, 以直径 2 cm 的烫头 75 °C 烫伤 15 s, 制备面积约 3.8 cm² 烫伤创面。烫伤 1 h 后每组随机抽取 1 只大鼠, 取创面皮肤组织, 切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 显微镜下观察。结果显示大鼠深二度烫伤模型制备后, 其表皮层、真皮乳头层及横纹肌都坏死, 炎性细胞大量浸润, 毛囊、皮脂腺、汗腺等附属器结构破坏坏死, 血管充血, 胶原纤维离散, 各组大鼠无明显差别, 病理变化符合深二度烫伤的创面特征^[13-14], 见图 1。各给药组大鼠烫伤后在其创面按

大鼠体重 0.01 g · g⁻¹ 均匀涂抹相应药物, 每日早中晚各 1 次, 正常组和模型组不做处理。

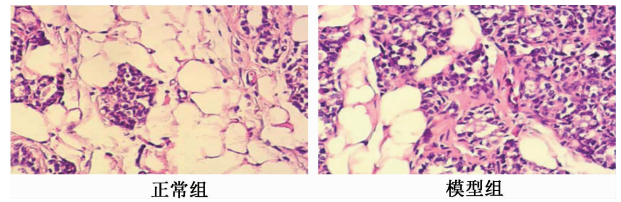


图 1 深二度烫伤大鼠模型组织病理形态学(HE, ×200)

Fig. 1 Pathomorphology of deep second degree scalded rats model (HE, ×200)

2.3.2 动物烫伤创面拍照观察及面积测定 分别在给药后第 1, 3, 7, 14, 21 天测定各时间段大鼠烫伤创面面积, 比较愈合情况并拍照。

2.3.3 大鼠烫伤组织病理形态学检查 分别在给药后第 7, 14, 21 天将各组采血后大鼠处死, 取创面上皮组织, 用 10% 甲醛溶液充分浸泡 24 h, 标本取材后, 放入生物组织自动脱水机内脱水, 浸蜡, 包埋。每组组织蜡块在切片机上连续切片 3 张, 切成 4 μm 厚度, 经烘片、脱蜡、苏木素染液染色和树脂封片后, 用显微镜观察烧伤组织病理形态学情况, 包括胶原纤维、炎性细胞浸润、成纤维细胞增生、新生毛细血管数量和肉芽组织等。

2.3.4 大鼠血清激素水平检测 分别在给药后第 7, 14, 21 天每组随机取大鼠 3 只, 眼眶静脉丛采血 1.0 mL, 置于用肝素润洗过的离心管中, 3 500 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书中操作流程检测各组大鼠血清中 TNF-α, IL-1β 和 MPO 含量。

2.3.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.4 生物碱类成分的含量测定

2.4.1 色谱条件^[15] Gemini-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.04 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (30:70), 柱温 40 °C, 检测波长 345 nm, 进样量 25 μL。

2.4.2 样品测定 精密称取 2.1 项下烧伤愈合膏和 2.2 项下不同工艺水凝胶各约 2 g, 置于烧杯中, 加入盐酸-甲醇 (1:100) 100 mL 超声 30 min, 称重, 用盐酸-甲醇 (1:100) 补足损失的质量, 滤过, 得供试液, 按上述色谱条件测定, 计算盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量。同法制备缺黄连药材阴性样品溶液。另取盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品适量, 配制混合对照品溶液。

2.5 挥发性成分的含量测定

2.5.1 气相色谱条件^[16] 以聚乙二醇 20000 (PEG20000) 为固定相, ZB-WAX 毛细管柱 (0.25 mm × 30 m × 0.25 μm), 涂布浓度 100%, 柱流量 1.0 mL·L⁻¹, 载气为氮气, 流速 30 mL·min⁻¹。柱温为程序升温 (初始温度 80 °C, 保留 5 min, 以 5 °C·min⁻¹ 的速率升至 180 °C, 终温保持 10 min), 进样口和检测器温度均为 200 °C, 分流比 10:1。

2.5.2 样品测定 精密称取 2.1 项下烧伤愈合膏和 2.2 项下不同工艺水凝胶各约 2 g, 分别加乙酸乙酯 100 mL 超声 30 min, 放冷后加乙酸乙酯补足损失的质量, 得各供试液。取各供试液 1 μL 注入气相色谱仪, 按上述条件测定, 计算 α-蒎烯、柠檬烯、异龙脑和龙脑的含量。同法制备缺乳香、没药、冰片药材阴性样品溶液。另取 α-蒎烯、柠檬烯、异龙脑和龙脑对照品适量, 配制混合对照品溶液。

3 结果

3.1 模型大鼠烫伤创面观察及愈合效果比较 大鼠经深二度烫伤造模后, 烫伤创面皮肤立即变白, 轻度肿胀, 肉眼可明显区分烫伤部位与正常区域。24 h 后创面色泽加深, 边界明显。给药后早期皮肤外观泛白, 各给药组及模型组烫伤创面颜色均呈进行性加深, 形成褐色焦痂, 质地较硬。给药后第 7 天, 各给药组大鼠创面透过焦痂均可见粗大血管网, 其间有些小血管与之相连。治疗 14 d 后,

半提取水凝胶组和烧伤愈合膏组烫伤创面痂壳脱落, 创面边缘皮肤愈合圆整, 未观察到感染情况发生, 创面面积与模型组有显著性差异 ($P < 0.05$); 全提取水凝胶组创面痂壳部分脱落, 创面边缘皮肤愈合不规则, 仍有部分褐色焦痂; 只含矿物质药材组和不含矿物质药材组烫伤创面焦痂大部分脱落, 与空白水凝胶组比较创面面积变化无差异。给药 21 d 后观察, 半提取水凝胶组和烧伤愈合膏组大部分动物烫伤创面已经脱痂, 创面平整, 新生皮肤有细小绒毛生长, 与周围皮肤比较, 颜色无差异, 烫伤创面基本愈合, 创面愈合面积与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。全提取水凝胶组创面仍未完全愈合, 创面凹凸不平, 皮肤边缘不整齐。只含矿物质药材组和不含矿物质药材组虽痂面均已脱落, 但烫伤创面愈合缓慢, 面积仍较大, 裸露皮肤呈红色。湿润烧伤膏组创面呈环形凹陷, 周围皮肤有绒毛长出, 但大鼠烫伤创面未完全脱痂, 烫伤创面愈合面积与模型组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

通过比较可知, 烧伤愈合膏组、半提取水凝胶组和湿润烧伤膏组大鼠烫伤创面面积的差异无统计学意义, 愈合情况均良好; 只含矿物质药材组和不含矿物质药材组烫伤创面未愈合。新剂型半提取水凝胶和原剂型烧伤愈合膏对大鼠深二度烫伤的治疗效果一致, 见表 1 和图 2。

表 1 各组大鼠不同时间的烫伤创面面积测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Wound areas of rats in each group at different times ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

cm²

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
模型	3.81 ± 1.27	3.76 ± 0.18	3.14 ± 0.31	2.51 ± 0.28	1.68 ± 0.23
空白水凝胶	3.85 ± 0.18	3.77 ± 0.14	3.16 ± 0.25	2.55 ± 0.13	1.66 ± 0.41
只含矿物质	3.82 ± 0.67	3.71 ± 0.38	3.11 ± 0.33	2.53 ± 0.36	1.60 ± 0.16
不含矿物质	3.87 ± 0.25	3.72 ± 0.63	3.18 ± 1.11	2.49 ± 1.08	1.57 ± 0.38
半提取	3.83 ± 0.52	3.72 ± 0.23	2.96 ± 1.03	1.63 ± 0.24 ¹⁾	0.31 ± 0.36 ²⁾
全提取	3.86 ± 1.23	3.74 ± 0.87	3.07 ± 0.16	2.33 ± 0.13	1.12 ± 0.43 ¹⁾
烧伤愈合膏	3.85 ± 0.62	3.69 ± 1.03	2.88 ± 0.24	1.56 ± 0.26 ¹⁾	0.28 ± 0.15 ²⁾
湿润烧伤膏	3.82 ± 0.69	3.74 ± 0.46	3.08 ± 0.45	1.67 ± 0.14 ¹⁾	0.29 ± 0.17 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 烧伤创面组织病理学观察 给药 7 d 后, 各组表皮层、真皮层及皮肤附属器均存在不同程度坏死; 模型组、空白水凝胶组、只含矿物质组和不含矿物质组炎性细胞浸润仍较多, 其余各组胶原纤维细胞与成纤维细胞数量增多, 炎性细胞浸润程度减轻。给药 14 d 后, 模型组和空白水凝胶组炎性细胞浸润仍

然严重, 表皮层、真皮层及角质层仍然坏死; 全提取水凝胶组、半提取水凝胶组、烧伤愈合膏组和湿润烧伤膏组新生少许表皮组织, 创面面积缩小, 真皮层及角质层坏死情况好转, 胶原纤维细胞与成纤维细胞数量持续增多, 炎性细胞浸润程度较 7 d 时观察结果进一步减轻; 只含矿物质组与不含矿物质组的病

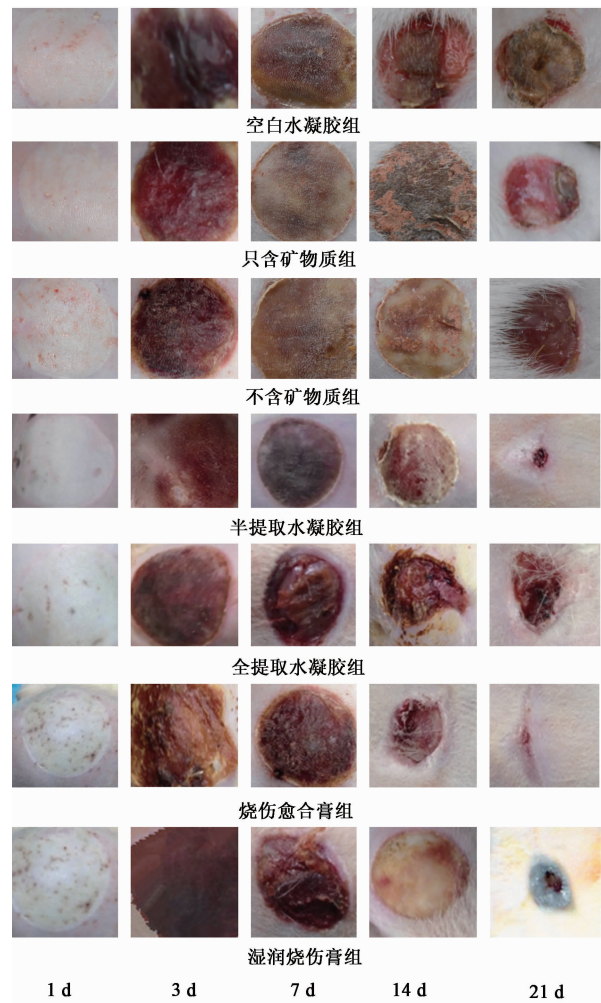


图 2 各给药组大鼠在不同时间段创面愈合效果

Fig. 2 Healing effects of wound at different times

理形态结果与模型组较一致,仅炎性细胞浸润较轻,不含矿物质组新生少量表皮组织,创面面积稍有缩小。给药 21 d 后,模型组与空白水凝胶组创面面积变化不大,新生表皮略向中央延伸,有少许新生胶原纤维,排列紊乱,毛细血管数量略增多,仍可观察到大量白细胞存在;半提取水凝胶组和湿润烧伤膏组,可见大量的肉芽组织、胶原纤维增多变粗和新生的表皮上皮化,部分溃疡面已愈合,组织结构较清晰;全提取水凝胶组和烧伤愈合膏组也可见大量肉芽组织增多变粗,但仍有部分炎性细胞浸润;只含矿物质组与不含矿物质组病理形态学结果改变较一致,创面缩小,新生部分胶原纤维及成纤维细胞,炎性细胞浸润现象未发生变化。病理形态学结果显示,给药 21 d 后,半提取水凝胶组对深二度烧伤的治疗效果优于原剂型烧伤愈合膏组,与阳性药治疗效果一致;在减轻炎性细胞浸润程度上优于全提取水凝胶组。只含矿物质组 and 不含矿物质组对深二度

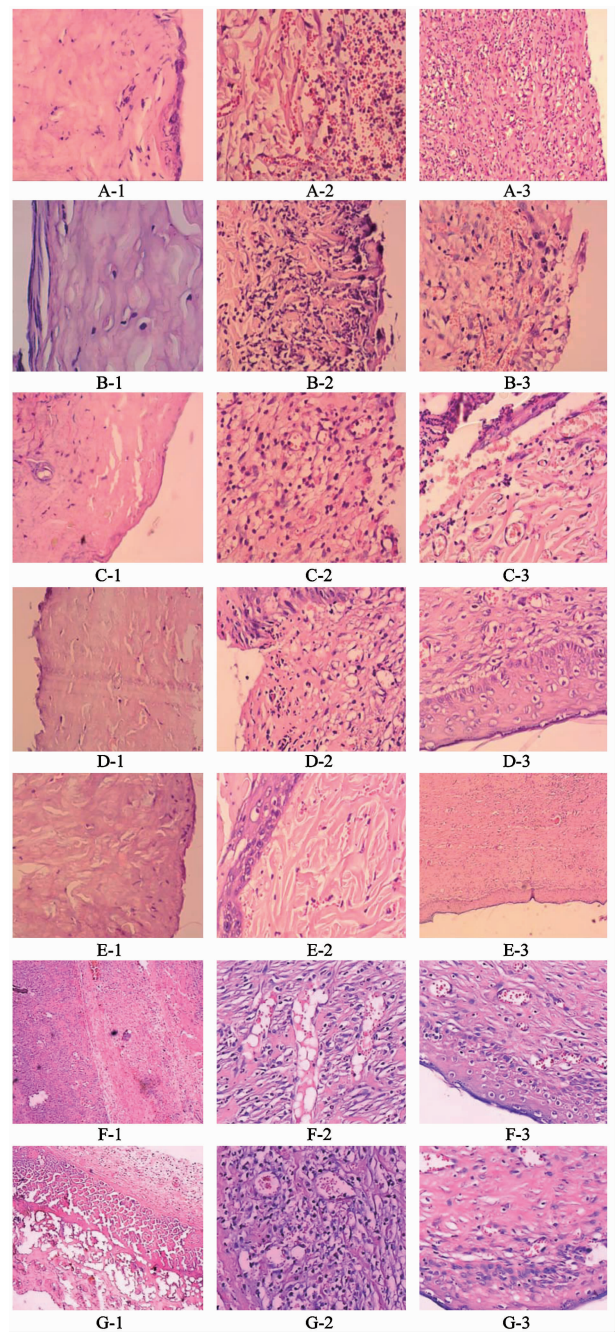


图 3 各给药组大鼠不同时期创面病理形态学观察 (HE, × 200)
1. 7 d; 2. 14 d; 3. 21 d

图 3 Wound pathomorphology of rats in each group at different times (HE, × 200)

烧伤的治疗效果较差,在给药周期内创面基本未愈合,炎症现象未发生好转。见图 3。

3.3 对 TNF- α , IL-1 β 及 MPO 炎症因子含量的影响 给药期间,与正常组比较,空白水凝胶组 TNF- α , IL-1 β 及 MPO 的含量明显升高 ($P < 0.05$), 升高趋势与模型组较一致,表明制备水凝胶的基质

对这 3 种炎症因子含量无影响。与模型组比较,在第 7,14,21 天各给药组均能降低 TNF- α 含量;尤其第 21 天时,半提取水凝胶组、全提取水凝胶组、烧伤愈合膏组及湿润烧伤膏组仍能降低 TNF- α , IL-1 β 及 MPO 的含量,半提取水凝胶组降低 3 个炎症因子含量的作用稍强于全提取水凝胶组及烧伤愈合膏组,与湿润烧伤膏组结果较接近。只含矿物质组和不含矿物质组仅能降低 TNF- α 含量,而对 IL-1 β 及 MPO 的含量变化无太大影响。结果见表 2~4。

表 2 不同组别大鼠血清中 TNF- α 的含量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	7 d	14 d	21 d
正常	66.29 \pm 4.12	66.82 \pm 3.06	67.46 \pm 2.65
模型	155.03 \pm 3.77 ¹⁾	135.39 \pm 0.96 ¹⁾	124.51 \pm 1.87 ¹⁾
空白水凝胶	154.24 \pm 1.47 ¹⁾	136.98 \pm 2.80 ¹⁾	122.82 \pm 5.40 ¹⁾
只含矿物质	139.99 \pm 1.40	126.43 \pm 1.04	112.53 \pm 6.17
不含矿物质	134.67 \pm 0.40	120.1 \pm 2.94	110.96 \pm 3.28
半提取水凝胶	95.74 \pm 0.99 ²⁾	81.13 \pm 0.96 ²⁾	72.39 \pm 0.95 ²⁾
全提取水凝胶	126.42 \pm 7.11	105.37 \pm 3.63	94.26 \pm 5.69
烧伤愈合膏	107.79 \pm 6.76 ²⁾	86.30 \pm 1.94 ²⁾	77.07 \pm 0.36 ²⁾
湿润烧伤膏	94.33 \pm 5.29 ²⁾	79.28 \pm 2.65 ²⁾	72.94 \pm 3.27 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3,4 同)。

表 3 不同组别大鼠血清中 IL-1 β 的含量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	7 d	14 d	21 d
正常	35.26 \pm 3.21	33.28 \pm 1.78	34.89 \pm 3.23
模型	186.86 \pm 1.48 ¹⁾	134.49 \pm 2.34 ¹⁾	97.60 \pm 2.24 ¹⁾
空白水凝胶	182.61 \pm 2.61 ¹⁾	136.02 \pm 2.69 ¹⁾	97.35 \pm 1.34 ¹⁾
只含矿物质	147.06 \pm 6.49	116.44 \pm 2.66	92.34 \pm 2.10
不含矿物质	136.37 \pm 2.42	93.40 \pm 1.41 ²⁾	87.41 \pm 1.58
半提取水凝胶	85.39 \pm 4.46 ³⁾	60.38 \pm 1.38 ³⁾	36.88 \pm 1.97 ³⁾
全提取水凝胶	116.94 \pm 7.80 ²⁾	80.74 \pm 3.60 ²⁾	72.14 \pm 0.94 ²⁾
烧伤愈合膏	89.97 \pm 0.42 ³⁾	65.55 \pm 4.25 ³⁾	39.58 \pm 1.45 ³⁾
湿润烧伤膏	85.77 \pm 5.09 ³⁾	61.39 \pm 2.18 ³⁾	36.63 \pm 1.47 ³⁾

3.4 生物碱类成分含量的测定 综合药效学试验可知,半提取水凝胶组治疗烫伤效果最佳,故确定以此作为水凝胶制备工艺。测定 3 批样品中生物碱类成分的含量,结果水凝胶中盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的质量分数分别为 0.335, 0.247, 1.609 mg·g⁻¹,烧伤愈合膏中三者质量分数依次为

表 4 不同组别大鼠血清中 MPO 的含量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	7 d	14 d	21 d
正常	15.91 \pm 1.33	15.27 \pm 2.78	16.82 \pm 3.82
模型	34.46 \pm 2.78 ¹⁾	31.50 \pm 1.39 ¹⁾	23.14 \pm 0.70 ¹⁾
空白水凝胶	34.41 \pm 3.41 ¹⁾	31.14 \pm 0.57 ¹⁾	22.29 \pm 1.14 ¹⁾
只含矿物质	33.10 \pm 0.57	28.52 \pm 0.99	21.96 \pm 0.57
不含矿物质	33.10 \pm 0.57	26.88 \pm 1.50	21.96 \pm 0.57
半提取水凝胶	24.91 \pm 1.14 ²⁾	22.29 \pm 1.14 ²⁾	17.05 \pm 0.57 ²⁾
全提取水凝胶	29.20 \pm 0.57	23.63 \pm 1.97 ²⁾	19.68 \pm 0.99
烧伤愈合膏	27.54 \pm 1.97 ²⁾	21.63 \pm 1.97 ²⁾	17.19 \pm 0.98 ²⁾
湿润烧伤膏	24.61 \pm 1.71 ²⁾	21.99 \pm 2.05 ²⁾	16.42 \pm 1.50 ²⁾

0.236, 0.164, 1.145 mg·g⁻¹,且每批水凝胶中各成分的含量均高于同批次愈合膏。盐酸小檗碱含量较其他 2 种生物碱类成分含量高,结果与文献[12]报道一致。说明水凝胶制备方法中对黄连药材单独提取的处理方式,与愈合膏中直接粉碎方式比较,更能提取出盐酸小檗碱、盐酸巴马汀及盐酸黄连碱。

3.5 挥发性成分含量的测定^[16] 结果 α -蒎烯、柠檬烯、异龙脑和龙脑 4 种挥发性物质在水凝胶中质量分数依次为 0.052, 0.149, 1.438, 1.643 mg·g⁻¹,愈合膏中则依次为 0.040, 0.103, 1.023, 1.141 mg·g⁻¹。说明水凝胶的制备方法较愈合膏直接粉碎式的制备方法对方中药材中挥发性物质含量损失影响更小。

4 讨论

不同制剂工艺对烫伤创面愈合效果、创面组织病理结构改变及动物体内炎症因子含量影响不一致。与原剂型烧伤愈合膏比较,半提取法制备水凝胶是根据处方中各药味化学成分理化性质的不同采取不同处理方式,从而可最大程度地保留原处方中药效物质,烧伤创面愈合完整,组织结构更为清晰,而烧伤愈合膏组与全提取法制备的水凝胶组仍可观察到部分炎性细胞存在,说明半提取法制备的水凝胶治疗效果更优。

半提取法与全提取法工艺的不同之处仅在于处方中矿物质药味处理方式的差异,矿物质药材采用直接粉碎成细粉加入制剂后的疗效要优于提取后加入,提示不同的处理方式对烫伤治疗效果有一定影响,矿物质药材只有与方中其他药材组方使用才会对烫伤创面愈合有一定促进作用,说明本方将此类药材作为佐药是科学的。

模型组较正常组大鼠 TNF- α 和 IL-1 β 在伤后第

7 天均明显升高,主要由于其创面未愈,有大量坏死组织存在。随着实验的继续,虽然 TNF- α 和 IL-1 β 水平呈下降趋势,但至第 21 天其水平仍较正常组明显偏高,病理结构表现出较重的炎症反应,表明大鼠的自愈能力不干扰本实验结果。空白水凝胶组、只含矿物质组和不含矿物质组对 TNF- α , IL-1 β 和 MPO 水平的影响均与模型组一致,说明水凝胶基质和矿物质类药物均不具有抗炎作用,惟有全方(半提取组、烧伤愈合膏组)的疗效最佳,再次佐证了该组方的科学性。

半提取法制备水凝胶在减轻创面组织炎性细胞浸润方面疗效较烧伤愈合膏更佳,这可能与药效物质含量在水凝胶中均高于烧伤愈合膏有一定关系。此外,已完成的药动学试验证实半提取法制备的水凝胶与烧伤愈合膏给药后,在模型大鼠体内药动学参数有明显差异。水凝胶组中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀及盐酸黄连碱 3 种成分在大鼠体内的生物利用度均优于烧伤愈合膏组,水凝胶组中 3 种生物碱类成分的药峰浓度提高了 1.2 ~ 2.6 倍, AUC_{0-24h} 提高了 1.2 ~ 1.7 倍^[17-18]。结合本文的药效学、药效成分含量测定试验结果和前期大鼠体内药动学数据,从量效关系角度证实了半提取法的制备工艺为最佳。

[参考文献]

[1] 黎鳌. 烧伤学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001: 17-18.
[2] 中华医学会. 临床诊疗指南烧伤外科学分册[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:19-21.
[3] Lu M M, Yang W J, Peng Z Z, et al. Fluorofenidone inhibits macrophage IL-1 β production by suppressing inflammasome activity [J]. Int J Immunopharmacol, 2015,27(1):148-153.
[4] Tsay T B, Yang M C, Chen P H, et al. Blocking TNF- α enhances *Pseudomonas aeruginosa*-induced mortality in burn mice through induction of IL-1 β [J]. Cytokine, 2013,63(1):58-66.
[5] Salgado R M, Alcántara L, Mercadillo P, et al. Post-burn hypertrophic scars are characterized by high levels of IL-1 β mRNA and protein and TNF- α type I receptors[J]. Burns,2012,38(5):668-676.

[6] Morsi N M, Abdelbary G A, Ahmed M A. Silver sulfadiazine based cubosome hydrogels for topical treatment of burns; development and *in vitro/in vivo* characterization [J]. Eur J Pharma Biopharm, 2014, 86 (2):178-189.
[7] 江敏君,邱玉友,廖新芳. 烧伤创面应用湿性愈合疗法的效果观察与成本效益分析[J]. 实用医学杂志, 2014,30(15):2523-2524.
[8] 徐彬,陈永刚,吴金虎,等. 烧伤愈合膏 HPLC-UV 指纹图谱的建立及盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的含量测定[J]. 医药导报,2013,32(12):1637-1641.
[9] Keorochana K, Chaiyasuk P, Muangman P. Prospective randomize-controlled comparison between silicone plus herbal extract gel versus *Aloe vera* gel for burn scar prophylaxis [J]. Wound Medicine, 2015, doi: org/10.1016/j.wndm.2015.04.001.
[10] Loo Y H, Wong Y C, Cai E Z, et al. Ultrashort peptide nanofibrous hydrogels for the acceleration of healing of burn wounds [J]. Biomaterials, 2014, 35 (17): 4805-4814.
[11] Shi Y H, Li L G, Chai J K, et al. Effect of Poloxamer 188 on deepening of deep second-degree burn wounds in the early stage [J]. Burns, 2012, 38 (1): 95-101.
[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 19.
[13] Rampy B A, Glassy E F. Pathology gross photography: the beginning of digital pathology [J]. Clin Lab Med, 2016,36(1):67-87.
[14] 黄德彬,胡泽华,余昭芬,等. 马桑提取物促进大鼠烧伤创面愈合的作用和机制[J]. 中国病理生理杂志, 2013,29(1):138-144.
[15] 章道华,徐彬,吴金虎,等. 烧伤愈合膏中 7 种成分的含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(24): 2099-2102.
[16] 邹吉利,徐彬,吴金虎,等. 烧伤愈合膏龙脑与异龙脑的含量测定[J]. 医药导报,2014,33(7):944-946.
[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:303-305.
[18] 徐彬,陈永刚,邹吉利,等. 烧伤愈合软膏及其水凝胶中 3 种小檗碱型生物碱的药动学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):99-102.

[责任编辑 刘德文]