儿茶凝胶的制备和抗炎药效学评价

郑晓玲，郑彩虹*

（浙江大学 医学院 附属妇产科医院，浙江 杭州 310006）

［摘要］ **目的**：制备儿茶凝胶，并对凝胶的释放行为和抗炎药效学进行研究。**方法**：以儿茶素和表儿茶素的含量总和占儿茶质量的百分比为提取率作为考察指标，采用正交试验，考察乙醇浓度、料液比、提取温度和超声时间 4 个因素对提取结果的影响，儿茶提取物以卡泊姆为基质，三乙醇胺为中和剂制成儿茶凝胶，对凝胶的体外释药性和大鼠抗炎药效进行研究。**结果**：超声波醇提法提取儿茶的优化工艺条件为乙醇浓度为 50%，料液比为 1∶12，超声时间为 35 min，提取温度为 60 ℃。儿茶凝胶处方卡波姆 9 400.5 g，甘油 5.0 g，儿茶提取物 50.0 mL，三乙醇胺 0.5 mL，儿茶凝胶细腻光洁、呈半透明；释放药物快；对角叉菜胶所致的大鼠足趾肿胀具有明显的抑制作用，作用时间与凝胶剂量呈正性相关。**结论**：儿茶凝胶配方合理，质量可控，具有明显的抗炎作用，可进一步研究开发。

［关键词］ 儿茶；提取；凝胶；体外释放；抗炎

儿茶是为豆科植物儿茶 *Acacia catechu*（L. f）*willd.* 的去皮枝、干的干燥浸膏，具有收湿、生肌、敛疮功效，主治溃疡不敛、湿疹、跌扑伤痛、外伤出血[1]，是一种被广泛应用的草本药物。早在明朝《本草述》中有记载，儿茶苦、涩，微寒，归肺经，现代学者 Amol 等[2-3]研究显示儿茶提取物对炎症具有明显的抑制作用，且能有效的缓解疼痛。宫颈柱状上皮异位（宫颈糜烂）是慢性宫颈炎最常见的局部病理改变，是最为常见的妇科病之一。据国内文献，约占已婚育龄妇女半数以上的人均有不同程度的宫颈糜烂，已成为严重威胁国人健康的重要疾病。在祖国医学中，宫颈糜烂归属于“带下病”范畴，其病因以湿热为主，儿茶具有清热作用，收敛功效，能够促进宫颈热毒消退，加快创面愈合。因此，本研究对儿茶进行提取，并将其制备成中药凝胶联合或单独用于宫颈糜烂的治疗，具有一定的新颖性和实用性。

李杏翠等[4]对儿茶的化学成分进行研究发现，儿茶水提液中乙酸乙酯部分中主要成分为儿茶素和表儿茶素，占 45.87%，34.40%，因此本研究以儿茶素和表儿茶素为质量控制指标，采用正交试验设计优选超声波醇提法提取儿茶中儿茶素和表儿茶素的提取条件，对提取液进行萃取后，用水溶性高分子材料——卡波姆制备儿茶凝胶，对凝胶的外观、稳定性、pH 进行质量评价，对凝胶的体外释药性及大鼠抗炎药效进行研究，以期为儿茶阴道给药新剂型的开发提供依据。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司），AE-240 电子分析天平（梅特勒-托利多仪器上海有限公司），高速离心机（Hearue 公司），SHY-2A 水浴恒温振荡器（江苏金坛市金城国胜实验仪器厂），pHSJ-5 型实验室 pH 计（上海精密科学仪器有限公司），YLS-7B 足趾容积测量仪（济南益延科技发展有限公司），QL-866 涡旋混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）。

卡波姆 940（BFGoodrich 公司，批号 AB12185），儿茶素对照品（中国药品生物制剂检定所，批号 877-200001），表儿茶素对照品（中国药品生物制剂检定所，批号 110878-200102），儿茶浸膏（杭州华东医药有限公司），角叉菜胶（Sigma 公司），乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

实验用 SD 大鼠，180 ~ 220 g，由浙江省医学科学院提供，合格证号 SCXK（浙）2008-0033，共 30 只，雌雄各半。给药前分笼，喂全价营养颗粒饲料，自由饮水，室温（22 ± 2）℃，湿度 55% ~ 60%。

2 方法与结果

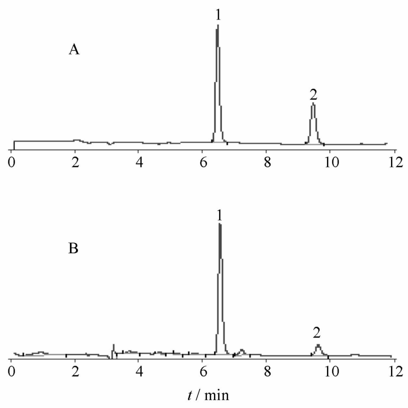
2.1 儿茶素和表儿茶素分析方法的建立

2.1.1 检测波长的选择 取儿茶素、表儿茶素对照

［稿件编号］ 20110323010
［基金项目］ 浙江省中医药科技计划重点项目（2008ZA010）
［通信作者］ *郑彩虹，博士，主任药师，研究方向为缓控释制剂的研究，Tel：（0571）87061501-1730，E-mail：chzheng@zju.edu.cn

品适量,用蒸馏水超声溶解,在 200 ~ 400 nm 扫描紫外吸收光谱,均在 280 nm 处有一最大吸收峰,本研究确定 280 nm 为儿茶素和表儿茶素的检测波长。

2.1.2 色谱条件 Zorbox extend C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相 0.3% 磷酸溶液(含 0.5% 三乙胺溶液)-乙腈(87∶13),流速 1.0 mL · min^{-1},柱温 35 ℃,检测波长 280 nm,进样量 20 μL。色谱图见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 儿茶素;2. 表儿茶素。

图 1 儿茶素和表儿茶素 HPLC 图

2.1.3 线性关系考察 精密称取儿茶素对照品 24.0 mg,表儿茶素对照品 12.8 mg,置 100 mL 量瓶中,加流动相超声溶解定容至 100 mL,得到含有儿茶素、表儿茶素对照品溶液。分别精密量取儿茶素对照品溶液 0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加流动相定容至刻度,摇匀,即得。在上述色谱条件下,进样 20 μL,记录色谱图,以峰面积(*Y*)对相应浓度(*X*)进行线性回归,儿茶素回归方程为 $Y = 11.906X + 3.5853$, $r = 0.9999$;表儿茶素回归方程为 $Y = 12.149X - 6.7458$, $r = 0.9999$。儿茶素在 12.0 ~ 192.0 mg · L^{-1} 线性关系良好,表儿茶素在 6.4 ~ 102.4 mg · L^{-1} 线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 1.0,4.0,7.0 mL,置 10 mL 量瓶中,配成低(含儿茶素 24.0 mg · L^{-1},表儿茶素 12.8 mg · L^{-1})、中(含儿茶素 96.0 mg · L^{-1},表儿茶素 51.2 mg · L^{-1})、高(含儿茶素 168.0 mg · L^{-1},表儿茶素 89.6 mg · L^{-1})3 种浓度的溶液,分别在日内重复进样 5 次,儿茶素低、中、高浓度的日内精密度 RSD 分别为 0.43%,0.56%,0.67%;表儿茶素低、中、高浓度的日内精密度 RSD 分别为 2.0%,0.31%,0.27%,结果表明日内精密度符合要求。

2.1.5 稳定性试验 取同一儿茶凝胶样品溶液在 0,2,4,6 h 测定,记录峰面积,儿茶素和表儿茶素含量的 RSD 分别为 1.6%,1.1%,说明供试液在 6 h 内稳定。

2.1.6 加样回收率试验 精密量取已知含量的儿茶凝胶样品溶液至 10 mL 量瓶中,再分别加入对照品溶液 0.5,2.0,5.0 mL,用流动相稀释至刻度,摇匀,进样,测得儿茶素低、中、高 3 种浓度的回收率($n = 3$)分别为 96.31%,102.3%,98.47%,9 份样品的平均回收率为 99.04%;表儿茶素低、中、高 3 种浓度的回收率($n = 3$)分别为 102.2%,96.70%,97.78%,9 份样品的平均回收率为 98.86%。

2.2 儿茶素和表儿茶素的提取

2.2.1 正交试验设计样品提取 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化儿茶中儿茶素和表儿茶素的提取。取儿茶适量,粉碎,精密称取 5.0 g,放入具塞瓶中,加入提取溶剂,浸泡过夜。恒温超声提取一定时间后,趁热离心,收集上清夜,回收上清夜中的乙醇,至无醇味后冷却至室温,收集浓缩液至 250 mL 量瓶中,用蒸馏水定容,得到儿茶提取液,备用。

以儿茶素和表儿茶素的含量总和占儿茶重量的百分比为提取率作为考察指标,根据文献[3],并结合预试验选用提取溶剂中乙醇的浓度、料液比、提取温度和超声时间为考察因素,因素水平安排见表 1。

表 1 儿茶提取工艺中考察的因素和水平

水平	*A* 乙醇浓度 /%	*B* 料液比	*C* 提取温度 /℃	*D* 超声时间 /min
1	50	1∶10	40	15
2	60	1∶12	50	25
3	70	1∶15	60	35

2.2.2 儿茶提取液中儿茶素和表儿茶素的含量测定 精密量取儿茶提取液 2.0 mL,置 100 mL 量瓶,用流动相稀释至刻度,摇匀,取适量 0.45 μm 膜过滤,HPLC 测定,记录儿茶素和表儿茶素的峰面积,计算得到各条件下儿茶素和表儿茶素的提取率,结果见表 2, 3。

表2　儿茶提取工艺正交试验　%

No.	提取率	No.	提取率
1	20.970	6	21.366
2	23.459	7	20.106
3	24.064	8	22.700
4	21.523	9	20.220
5	22.593		

表3　儿茶提取工艺方差分析

因素	偏差平方和	*F*	*P*
A	4.992	2 496.0	<0.05
B	6.317	3 158.5	<0.05
C	0.605	302.5	<0.05
D	3.653	1 826.5	<0.05
误差	0.001		

注:$f=2$。

方差分析可知各因素对儿茶素和表儿茶素提取效果影响的主次顺序为料液比、提取溶剂中乙醇浓度、超声时间和提取温度,且在统计学上均有显著性差异($P<0.05$)。根据试验结果确定儿茶中儿茶素和表儿茶素的最佳提取工艺为料液比1∶12,乙醇浓度50%,超声时间35 min,提取温度60 ℃。

2.3　儿茶素凝胶的制备

取儿茶适量50.0 g,根据最佳提取工艺条件,按**2.2.1**项下制备得到无醇味的浓缩液后,用1∶2.5的乙酸乙酯与浓缩液混合,1 800 r·min^{-1}涡旋振荡混合5 min,静置,分层,移取乙酸乙酯部分,回收乙酸乙酯,加蒸馏水50.0 mL溶解沉淀物,离心,取上清液,备用。

取卡波姆0.5 g,甘油5.0 g,加入上述上清液,充分溶胀,加入0.5 mL三乙醇胺,缓慢搅拌,使成凝胶状,加水至50.0 g,即得。

2.4　凝胶质量评价

2.4.1　儿茶凝胶剂的外观评价和pH测定　儿茶凝胶为亮棕红色半固体,质地均匀细腻,稠度适宜,涂展性好。

取儿茶凝胶约1.0 g加入10 mL蒸馏水,用pH计精密测定。儿茶凝胶pH为5.20,符合阴道用凝胶pH 4.5~5.5。

2.4.2　稳定性试验　取本品5.0 g置于离心管中,以4 000 r·min^{-1}离心40 min,无分层现象,有较好的稳定性。

取本品适量,装于密闭小瓶中,放于55 ℃恒温箱中24 h,凝胶均无分层和霉变现象;置冰箱0 ℃中放置24 h,无分层和霉变现象,颜色由亮棕红色变为暗棕红色,40倍显微镜下观察0 ℃冰箱放置后的凝胶,可见凝胶中有颗粒状固体析出。

2.4.3　儿茶凝胶中儿茶素和表儿茶素的含量测定　精密称取儿茶凝胶0.80 g,加流动相溶解并定容至250 mL,0.45 μm微孔滤膜过滤后HPLC测定儿茶素和表儿茶素含量,结果儿茶凝胶中含儿茶素和表儿茶素分别为21.14,28.05 mg·g^{-1}。

2.4.4　体外释药性研究[5]　采用自制的扩散池进行凝胶释药性测定,将透析袋(M_W<12 000)一端用密封封口夹固定,儿茶凝胶2.0 g小心紧密填放入面积约为6.25 cm^{2}的透析袋中,另一端密封封口夹固定,不能留有气泡,以此作为儿茶凝胶的释放池装置。将此装置小心放入0.9%生理盐水100 mL接收液中,(37±0.5) ℃, 100 r·min^{-1}恒温水浴振荡,于不同的时间点吸取20 mL释放液,0.45 μm微孔滤膜过滤后HPLC分析儿茶素和表儿茶素含量;同时补充等量的释放介质。

累计渗透量Q按公式计算:

$$Q_i=C_iV+\sum_{2}^{n}C_{i-1}V_i, P_i=Q_i/Q_0\times100\%$$

式中Q_i为第i次取样时累计渗透量,C_i为第i次取样时接收液中的药物浓度,V为接收液体积,C_{i-1}为第($i-1$)次取样时接收液中的药物浓度,V_i为每次取样体积,P_i为第i次取样时累计释放百分比,Q_0为儿茶凝胶药物释放总量。以药物累计释放百分比P为纵坐标,时间t为横坐标作图,得药物累计释放曲线,结果见图2。以累计渗透量Q为纵坐标,时间t为横坐标作图,得药物累计渗透曲线,对所得曲线的直线部分进行回归,求出斜率,本文的有效扩散面积6.25 cm^2,斜率与有效面积的比值即为药物稳态渗透速率,结果为0.72 mg·cm^{-2}·h^{-1}。

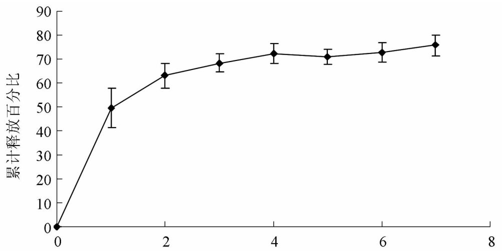


图2　儿茶凝胶的体外释药曲线

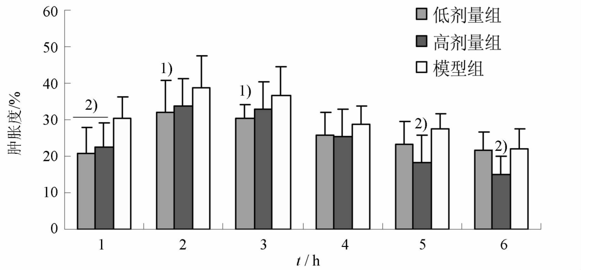
2.5 儿茶凝胶对角叉菜胶所致大鼠足趾肿胀试验

2.5.1 角叉菜胶致大鼠足趾肿胀 SD 大鼠 30 只，雌雄各半，随机分为 3 组，每组 10 只，分别为模型组、儿茶凝胶高剂量组和低剂量组。用苦味酸在大鼠右后肢关节周围做一标记，用足趾容积测定仪测定大鼠正常足趾容积。模型组、儿茶凝胶高剂量组和低剂量组每只大鼠分别用生理盐水 0.05 mL/只、儿茶凝胶（相当于儿茶素和表儿茶素总质量分数 12.5，50.0 $mg \cdot kg^{-1}$）分别涂布于右后足趾内外，每 1 h 给药 1 次，连续 3 次，末次给药后 0.5 h，用注射用水将大鼠右后足趾上的凝胶洗净，分别在大鼠的右后足趾皮下注射 1% 新鲜角叉菜胶混悬液 0.1 mL/只致炎。每隔 1 h 测定 1 次大鼠足趾容积，连续测定 6 次，记录结果，并分别计算肿胀率和肿胀抑制率。

$$\text{肿胀度} = \frac{\text{致炎后足趾容积} - \text{致炎前足趾容积}}{\text{致炎前足趾容积}} \times 100\%$$

$$\text{肿胀抑制率} = \left(1 - \frac{\text{肿胀度}_{\text{儿茶给药组}}}{\text{肿胀度}_{\text{模型组}}}\right) \times 100\%$$

2.5.2 儿茶凝胶对角叉菜胶所致大鼠足趾肿胀试验的影响 儿茶凝胶对角叉菜胶所致大鼠足趾肿胀度影响结果影响见图 3，肿胀抑制率结果见表 4。



与模型组相比[1)] $P<0.05$，[2)] $P<0.01$；高剂量组相当于儿茶素和原儿茶素总质量分数 50.0 $mg \cdot kg^{-1}$；低剂量组相当于儿茶素和原儿茶素总质量分数为 12.5 $mg \cdot kg^{-1}$（表 4 同）。

图 3 儿茶凝胶对大鼠足趾肿胀度的影响

表 4 儿茶凝胶对大鼠足趾肿胀抑制率 %

剂量	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
高剂量	26.70	13.45	10.87	12.26	32.54	32.50
低剂量	31.66	17.51	17.14	10.27	15.82	1.32

角叉菜胶致炎后 1 h，大鼠足趾开始出现急性炎症样红、肿等变化，约 2 h 肿胀达到高峰。儿茶凝胶低剂量组在 1，2，3 h 时间点对大鼠足趾肿胀有明显的抑制作用（$P<0.05$），高剂量组在 1，5，6 h 时间点对大鼠足趾肿胀有明显的抑制作用（$P<0.01$），儿茶凝胶高剂量组比低剂量组对大鼠足趾肿胀抑制作用时间更长。

3 讨论

儿茶凝胶在 0 ℃冰箱放置后有颗粒状固体析出，可能由于缩合鞣质存在。缩合鞣质是主要以儿茶素为前体物质，各单元之间的 C-C 键或 C-O 键缩合而成的鞣质，溶于乙酸乙酯和水。缩合鞣质在水溶液中是一种胶体状态，高温可破坏胶体的稳定性，低温可使之沉淀。将凝胶 0 ℃在冰箱放置 24 h 后，缩合鞣质析出形成沉淀，建议储藏条件为 20～25 ℃。

中药提取物中存在很多离子，离子的量和游离状态都无法知道，多价离子的存在直接影响凝胶体系的黏性，增加了凝胶制备的难度。卡波姆因其不仅具有良好的兼容性、黏合性、凝胶性，还具有良好的乳化性、增稠性、助悬性和成膜性，适合中药凝胶制备基质。有研究显示[6]，中药提取液对卡波姆凝胶体系流变性会产生影响，药物的加入会降低原凝胶体系的表观黏度，1% 中药卡波姆凝胶的黏度尚未有明显的变化，但随着卡波姆浓度的增加，中药凝胶的黏度降低越明显。本凝胶卡波姆浓度为 1% 或 2% 时均可获得满意的性状，且易于涂敷分散，体外释放快。结合实际情况综合考虑，1% 卡波姆凝胶即已适合儿茶凝胶的制备。

角叉菜胶致大鼠足趾肿胀模型是一个评价或筛选药物抗炎作用的经典急性炎症模型，应用十分广泛。注射角叉菜胶后大鼠足部 0.5 h 开始发生炎症并肿胀，其发生的机制可能为以下 2 点：在炎症发生早期（90～180 min）是由于组胺类物质的释放引起，在炎症后期（270～360 min）是由前列腺素，蛋白酶类物质的释放激活了激肽类物质的活性引起。儿茶凝胶抑制角叉菜胶致大鼠足肿胀作用时间与剂量呈正性关系可能是由于儿茶提取物能有效减少这 2 个时期内组胺类物质、前列腺素、蛋白酶类物质等致炎物质的释放，儿茶凝胶中释放的药物经皮吸收后，在组织局部形成药物贮备库，发挥消炎和消肿作用，低剂量组组织中药物贮存有限，4 h 后药物已不能到有效的抑制浓度，所以不能再有效地抑制大鼠足趾肿胀，发挥疗效的时间短暂；高剂量组在组织局部形成了高浓度的药物贮库，初始发挥作用后，由于儿茶

素类药物引起的毛细血管收缩,影响药物的进一步吸收,使得 2 ~ 4 h 时与模型组没有显著性差异,随着贮库中药物释出又发挥其疗效,作用时间长久。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:9.

[2] Amol M B, Ajay D K, Neeraj S V, et al. Potential analgesic, anti-inflammatory and antiocidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48: 3412.

[3] Zhang S Y, Zheng C G, Yan X Y, et al. Low concentration of condensed tannis from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells[J]. Biochem Biophys Res Comm, 2008, 371: 654.

[4] 李杏翠,王洪庆,刘超,等. 儿茶化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(11):1425.

[5] 张蜀艳,梁慧,颜钫,等. 麻风树酚凝胶剂的制备及体外释药性研究[J]. 时珍国医国药,2009, 20(8):1895.

[6] 颜冬梅,朱卫丰,刘红宁,等. 药物对卡波姆凝胶体系流变性能的影响[J]. 中成药,2008,30(11):1687.

Preparation and pharmacodynamics studies on anti-inflammatory effect of catechu gel

ZHENG Xiaoling, ZHENG Caihong*

(*Women's Hospital*, *School of Medicine*, *Zhejiang University*, *Hangzhou* 310006, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To prepare the gel of Chinese medicine catechu, study its release mechanism *in vitro* and observe the anti-inflammatory activity in rats. **Method**: Using the amount of catechin and epicatechin in dry extract as major evaluation factors, orthogonal experiment was carried out to investigate four influential factors of the ethanol concentration, ratio of raw material to solvent, ultrasonic time and extraction temperature. The catechu gel was prepared by using carbomer-940 as the gel base, and triethanomine as neutralizer. The experiments on drug-releasing profiles *in vitro* and the phamacodynamics studies on the anti-inflammatory in rats were carried out, respectively. **Result**: The optimum condition of extraction from catechu was as follows, the concentration of ethanol, ratio of raw material to solvent, ultrasonic time, and extraction temperature were 50%, 1∶12, 35 min and 60 ℃, respectively. The formulation of catechu gel was carbomer-9 400. 5 g, glycerol 5. 0 g, the extracts of catechu 50. 0 mL, and triethanomine 0. 5 mL. The gel was semitransparent and stable. The drugs released quickly. The catechu gel reduced the paw edema considerably in dose-dependent manner compared to carrageenan-induced rat. **Conclusion**: The formulation of the catechu gel is reasonable, and it shows remarkable anti-inflammatory activity. It is worth doing further research.

[**Key words**] catechu; ultrasonic extraction; gel; anti-inflammatory; release *in vitro*

doi:10. 4268/cjcmm20111809

[责任编辑 马超一]