

蛇床子乳剂的制备及体外抗阴道滴虫考察

杨婧, 姜霖铭, 王锐*

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:将蛇床子中的总香豆素制成 o/w 型乳剂,并考察其体外抗阴道滴虫药理活性。方法:采用超声法提取蛇床子中的总香豆素,选取乳化时间、乳化次数、乳化压力及乳化剂加入顺序为考察因素,通过单因素试验优选蛇床子乳剂的制备工艺,并考察其体外抗阴道滴虫药效学试验。结果:确定的蛇床子乳剂制备工艺为乳化时间 15 min,乳化压力 150 MPa,乳化 3 次,乳化剂加入顺序为油相加入到水相;确认其对临床分离的阴道滴虫有较好的抑制作用。结论:该制备工艺稳定可行,制备的乳剂对阴道滴虫产生抑制作用的最低药物质量浓度 0.15~0.62 g·L⁻¹。

[关键词] 蛇床子素;乳剂;抗阴道滴虫

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0031-03

Preparation of *Cnidium monnieri* Emulsion and Investigation of its *in vitro* Anti-trichomonas Vaginalis

YANG Jing, JIANG Ji-ming, WANG Rui*

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare o/w type emulsion with total coumarin from *Cnidium monnieri*, and investigate its *in vitro* anti-trichomonas vaginalis activity. **Method:** Total coumarin from *C. monnieri* was extracted by ultrasonic method with emulsification time, times and pressure, adding order of emulsifier as factors, single factor test was used to optimize preparation technology of *C. monnieri* emulsion, and its pharmacodynamic trial of *in vitro* anti-trichomonas vaginalis was investigated. **Result:** Preparation technology of *C. monnieri* emulsion was ascertained as follows: emulsification 3 times at 150 MPa, 15 min each time, adding order of emulsifier with oil phase added to aqueous phase; and this emulsion had good inhibition on trichomonas vaginalis. **Conclusion:** This preparation technology was stable and feasible, minimum drug concentration of this emulsion had good inhibition effect to trichomonas vaginalis was 0.15-0.62 g·L⁻¹.

[Key words] osthol; emulsion; anti-trichomonas vaginalis

滴虫性阴道炎是妇科的常见病之一,多发于 20~40 岁的育龄妇女^[1]。蛇床子具有温肾壮阳、祛风、燥湿及杀虫之功效,主治宫冷、阳痿、寒湿滞下和妇人瘙痒等。研究发现其化学成分较复杂,主要含

有挥发油、蛇床子总香豆素(TCFC),其中主要以蛇床子素和欧前胡素为主^[2]。本文采用超声法提取蛇床子中的总香豆素,并将其制备成 o/w 型乳剂,通过体外抗阴道滴虫药效学试验,考察其抑制阴道滴虫的效果,为蛇床子的开发提供试验依据。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(2996 型检测器, Empower 工作站,美国 Waters 公司),APV 型高压乳匀机(北京同和友德科技有限公司),TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂),蛇床子(购自哈药集团世一堂中药饮片有限责任公司,经药剂教研室鉴定为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实),蛇床子素对照品(中国药品生物

[收稿日期] 20120721(001)

[基金项目] 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金(2012RFQXS040);教育部博士点基金(20112327110009)

[第一作者] 杨婧,在读博士,讲师,从事微生物学与免疫学、病理学的研究, Tel: 0451-82195940, E-mail: Yangjingdx@sina.com

[通讯作者] *王锐,硕士,副教授,从事新药研发及新剂型研究, Tel:0451-87266893, E-mail: wrdx@sina.com

制品检定所,批号 201004),活性炭(国药集团化学试剂有限公司),滴虫培养液(黑龙江中医药大学实验中心自制),甲硝唑(宏达制药有限公司),亚甲蓝(天津科密欧化学试剂有限公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蛇床子提取物的制备^[3-5] 称取蛇床子药材 50 g,粉碎,加 95% 乙醇 100 mL,于功率 360 W 条件下超声回流提取 1.5 h,残渣重复提取 2 次,合并提取液,减压浓缩,加入 1.25% 的活性炭脱色,抽滤,70 °C 真空干燥至恒重,即得含有蛇床子素的总香豆素提取物。

2.2 乳剂制备工艺 以西黄芪胶和阿拉伯胶为乳化剂,采用高压乳匀机法制备。

2.2.1 乳剂加入顺序考察 高速搅拌情况下,分别采用水相加到油相法和油相加到水相中 2 种工艺进

行制备,成初乳后以 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,观察初乳分层及漂油情况。

2.2.2 乳化时间考察 高速搅拌情况下,制备成初乳后开始计时,分别持续搅拌 5,10,15 min,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,观察初乳分层及漂油情况,考察不同乳化时间对初乳稳定性的影响。

2.2.3 乳化压力考察 分别在 100,150,200 MPa 压力水平下制备成初乳,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,观察初乳分层及漂油情况,考察不同乳化压力对初乳稳定性的影响。

2.2.4 乳化次数考察 在制备初乳的过程中,分别设定匀质数为 1,3,5 次,每次间隔 3 min,分别以 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,观察初乳分层及漂油情况,考察不同乳化次数对初乳稳定性的影响。试验结果见表 1。

表 1 蛇床子乳剂制备工艺的单因素试验考察

项目	乳剂加入顺序		乳化时间/min			乳化压力/MPa			乳化数/次		
	油相加入 到水相	水相加入 到油相	5	10	15	100	150	200	1	3	5
分层	无分层	无分层	有分层	无分层	无分层	有分层	无分层	无分层	无分层	无分层	无分层
油滴	偶有油滴	无油滴	较多油滴	少量油滴	无油滴	偶油滴	无油滴	无油滴	偶有油滴	无油滴	无油滴
	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮

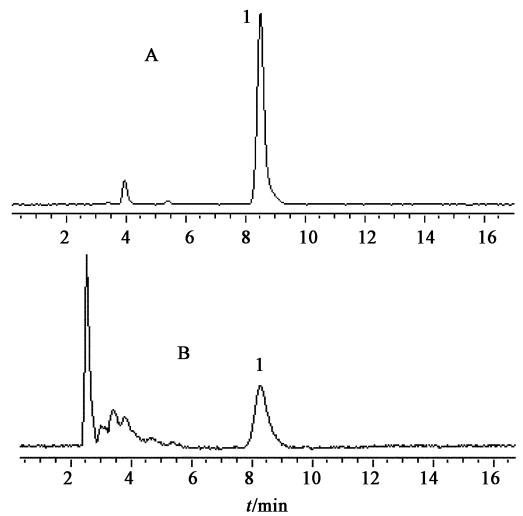
由表 1 可知,加入顺序对乳剂的稳定性略有影响;在一定范围内,乳化时间越长越有利于初乳的稳定性,但从漂油情况看,时间长更佳,故选择乳化时间 15 min;乳化压力越大则效果越佳,但综合考量采用 150 MPa;乳化次数对乳剂的稳定性呈正性相关,无分层却偶有油滴出现,说明乳化次数虽对稳定性影响不大,但对乳剂是否成型有一定的影响,但单位时间内乳化次数越多,单次乳化时间越短,越不利于制备,故确定 3 次。最终制备工艺确定为取糖精钠适量加水少许使溶解,备用。取西黄芪胶、阿拉伯胶各 10 g,制成胶浆,备用。将蛇床子提取物 20 g,胶浆液、糖浆液和水(约 1 L)放入高压乳匀机中,按优选工艺参数制成蛇床子 o/w 型乳剂。

2.3 乳剂的质量检测

2.3.1 蛇床子素含量测定

2.3.1.1 色谱条件 DiamonsilC₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(80:20),柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,测定波长 323 nm。见图 1。

2.3.1.2 标准曲线的制备 精密称取蛇床子素对照品 1.0 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇定容并制成



A. 对照品;B. 供试品溶液;1. 蛇床子素

图 1 蛇床子乳剂 HPLC

质量浓度 40.0 mg·L⁻¹ 对照品储备液。分别精密吸取上述对照品储备液 0.1,0.5,1,1.5,2,2.5 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。精密吸取上述滤液各 20 μL,依次注入高效液相色谱仪,测得峰面积。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得蛇床子素线性回

归方程 $A = 32\ 999C - 4\ 632.7 (R^2 = 0.999\ 4)$, 表明蛇床子素在 $0.8 \sim 20.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

2.3.1.3 精密度试验 精密吸取蛇床子素供试品溶液 $20\ \mu\text{L}$, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, RSD 1.45% , 表明仪器精密度良好。

2.3.1.4 回收率与稳定性试验 精密称取一定量蛇床子素对照品, 加入到已知含量的蛇床子素溶液中, 在上述色谱条件下进行测定。结果平均回收率 100.06% , RSD 0.76% , 表明方法准确性高。精密吸取蛇床子素供试品溶液 $20\ \mu\text{L}$, 于制备后 $0, 6, 12, 18, 24\ \text{h}$ 进行测定, 结果 RSD 0.66% , 表明供试品溶液在 $24\ \text{h}$ 内稳定。

2.3.1.5 样品测定 吸取乳剂约 $0.1\ \text{mL}$, 置 $50\ \text{mL}$ 量瓶中, 用甲醇超声定容, 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 精密吸取滤液 $20\ \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪, 测得峰面积并计算蛇床子素含量。

2.3.2 乳剂类型的确定 以胶头滴管吸取乳剂 $1 \sim 2$ 滴, 涂布在载玻片上, 滴上亚甲蓝溶液, 在镜下观察, 若仅外相染色, 则为 o/w 型蛇床子乳剂。

2.3.3 质量稳定性测定 将乳剂放入离心机中, 以 $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $15\ \text{min}$, 观察是否分层, 如若分层则认为其质量不稳定。

2.3.4 乳剂质量检测 按确定的最佳工艺制备蛇床子乳剂, 按 2.3 项下方法进行测定, 结果乳剂中蛇床子素质量浓度 $(12.36 \pm 0.13)\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。乳剂亚甲蓝染色法进行类型鉴别, 可见外相呈蓝色, 而内相为透明圆形亮点, 可判定其为 o/w 型乳剂。以 $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $15\ \text{min}$, 未见分层和油滴现象, 说明质量稳定可靠。

2.4 体外抗阴道滴虫试验

2.4.1 试验药液配制 取乳剂 $10\ \text{mL}$, 测定并计算含药质量浓度, 待用。取甲硝唑 $20\ \text{mg}$ 加水稀释定容至 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 得到 $2\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药液。

2.4.2 标本培养液制备^[3] 将滴虫培养液放入高压灭菌器中灭菌 $30\ \text{min}$, 按培养液-无菌牛血清 ($4:1$) 加入无菌牛血清, 分别加入青霉素和链霉素, 各配成质量浓度 $0.1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含药标本培养液, 以用于抑制除阴道滴虫以外的其他细菌的滋生。

2.4.3 标本培养 取患者阴道分泌物, 镜下检查确认有阴道滴虫后, 加入到标本培养液中, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 下增殖培养 $48\ \text{h}$, 取培养液用白细胞计数器在显微镜下进行计数, 根据计数结果, 将其配制成含有滴虫数为 10^5 个/mL 的溶液。

取不含蛇床子提取物阿拉伯胶和西黄耆胶溶液

为空白溶液。以不含药物的滴虫溶液为阴性对照液。分别从乳剂和甲硝唑溶液中吸取 $0.1\ \text{mL}$ 溶液, 加入到 $0.9\ \text{mL}$ 标本液中, 倍比稀释。将含有滴虫数为 10^5 个/mL 的滴虫液 $0.1\ \text{mL}$, 分别加入到各溶液中, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 下培养 $24\ \text{h}$, 取出培养液, 在显微镜下观察结果, 以培养液中无活动滴虫的最小药物质量浓度为其抑制滴虫的质量浓度。结果见表 2。

表 2 蛇床子乳剂体外最低抑制滴虫质量浓度测定 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

	甲硝唑	蛇床子乳剂
1	0.05	0.309
2	0.025	0.154
3	0.1	0.618
4	0.1	0.618
5	0.05	0.618
6	0.0125	0.154
7	0.025	0.309
8	0.05	0.618
9	0.0125	0.154
10	0.05	0.618

由表 2 可知, 蛇床子乳剂对 10 份临床分离出的阴道滴虫均有较好的抑制作用, 抑制滴虫生长的最低药物质量浓度为 $0.15 \sim 0.62\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

蛇床子脂溶性提取物制成水包油型乳剂, 工艺简单、稳定、可靠, 不仅可有效提高其顺应性, 宜于患者使用, 更经体外抑制滴虫试验, 证明其对阴道滴虫有着较好的抑制效果。

[参考文献]

- [1] 张丽娟, 孙宝清, 谭桂莲, 等. MTT 法测定蛇床子素包合物对阴道毛滴虫的杀灭作用[J]. 中成药, 2011, 33(12): 2163.
- [2] 宫竹云, 张高勇, 聂永亮, 等. 超临界 CO_2 萃取工艺对蛇床子提取物提取率的影响[J]. 中成药, 2006, 28(8): 1102.
- [3] 林秀仙, 李菁, 张淑华, 等. 地肤子超临界 CO_2 萃取物抗阴道滴虫药效学研究[J]. 中药材, 2005, 28(1): 44.
- [4] 吴艳芳, 王新胜, 尹延彦, 等. 超声辅助提取连翘总黄酮工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 30.
- [5] 苏秀芳, 秦健梅. 超声辅助法提取剑叶龙血树根总黄酮的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 97.

[责任编辑 仝燕]