

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.12.8

中药驱螨软膏剂癣螨灵的制备及质量评价

李思琪¹,程嘉奇²,何先林¹,李龙娇¹,薛小瑜¹

(1. 重庆三峡职业学院,动物科技学院,重庆 404155; 2. 重庆幼儿师范高等专科学校,重庆 404047)

[收稿日期] 2020-05-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 12-0044-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了研发安全性高、低残留的动物驱螨制剂,本研究选用大风子、苦参、百部、蛇床子、老鹳草 5 味中药,制备复方中药软膏剂癣螨灵。在前期正交试验及动物临床实验设计下,筛选出最优中药配比,采用水提醇沉法提取中药的有效成分,并优选 O/W 乳剂型作为软膏基质,配制成 25% 浓度软膏。对中药软膏剂外观性状、稳定性、皮肤刺激性及毒副反应等质量标准进行综合评价。结果表明,中药软膏剂癣螨灵外观细腻、质地均匀、稳定性高,安全性高,未见毒副反应,具有良好研发前景。

[关键词] 中药软膏剂;螨虫;皮肤病;质量评价

Preparation and Quality Control of Traditional Chinese Herbal Medicines Xian Man Ling Ointment for Treating Mite Disease

LI Si - qi¹, CHENG Jia - qi², HE Xian - lin¹, LI Long - jiao¹, XUE Xiao - shu¹

(1. Institute of Animal Science and Technology, Chongqing Three Gorges Vocational College, Chongqing 404155, China;

2. Chongqing Preschool Education College, Chongqing 404047, China)

Abstract: In order to prepare a safety and low residual animal mite repellent, in this study, five traditional Chinese medicine was used for preparing ointment Xian Man Ling. After orthogonal experiment and animal clinical experiment, the best proportion of traditional Chinese medicines was selected. Effective components of traditional medicine was extracted by water extraction and precipitation method. Then, O/W emulsion was choosed for ointment bases, and the concentration of traditiona Chinese meidicine ointment was 25%. To appraise the security evaluation of traditiona chinese meidicine ointment, the cutaneous acute toxicity, irritation and allergic tests were carried out on rabbits. The tests showed that, traditional chinese medicine ointment Xian Man Ling has fine appearance, uniform texture, high stability, no toxic and side effects. It would have a good research and development prospect.

Key words: traditional Chinese medicine ointment; mite; skin disease; quality appraisemen

基金项目: 重庆市教委科技项目 (KJ1603308)

作者简介: 李思琪,副教授,农学硕士,从事临床兽医诊断与治疗研究及教学。E-mail:5102727@qq.com

螨病在西南地区是动物体表高发寄生虫病,据报道,西南地区养殖场内螨病的感染率高达 60% 以上^[1]。螨病的感染将导致动物体表大面积脱毛,皮肤瘙痒,动物表现剧烈不安,食欲不振,会在各处进行摩擦,导致皮肤损伤。从而对动物生长、发育、繁殖造成极大危害以及养殖户的养殖成本带来影响。传统治疗药物多为化学治疗药,长期使用过程中,能导致蓄积中毒,并且引发动动物产品安全性问题,从而迫切需要新药品的研发,降低西南地区螨病的感染率^[2]。

在中医上,螨虫病被称为疥癣、疥疮,是一种人与动物常见皮肤病。中医认为疥癣的感染虽在体表,但与内在脏腑、气血有密切关系。若脏腑功能失调,经络不利,气血壅滞,湿、热、虫三邪乘机侵入,就会引起局部病变^[3]。《黄帝内经》中提出风为百病之长,皮肤为人体防御外界的第一道屏障。故风邪是皮肤病感染的第一个致病因素。《素问·阴阳应象大论》中明确指出了出汗后,毛孔打开、腠理疏松、湿邪侵袭肌肤所致容易引起皮肉经脉疾病,所以湿邪也是导致疥癣发生的一个重要因素^[4]。除此以外,肺火和心燥,导致气血津液丧失,也会引起皮肤病问题。而螨虫病因为瘙痒,动物常不停挠擦,皮肤会有溃烂,结痂,甚至皮肤出血,坏死等病理现象出现,故也需修复皮肤屏障。因此,在选用驱螨中药中,主要以杀虫抑菌、祛风、润燥除湿、清热解毒、活血生肌、润滑皮肤作为中药筛选理论。

考虑到规模化养殖动物数目众多,外敷法方便实施,能节约人力成本,并且制备工艺条件较为简单,便于推广。因此,在选用制备方法时,主要以软膏剂作为制备剂型。本试验中以苦参、百部、大风子、蛇床子、老鹳草、羊毛脂、凡士林等为主要处方,并进行软膏剂型的开发,以研制出一种易于涂抹、透气性好、疗效确切、性质稳定的中药软膏剂型。同时,根据《中华人民共和国兽药典》(2015 版)关于软膏制剂的质量要求,对癣螨灵软膏剂的制剂工艺、质量标准、制剂稳定性等进行了科学研究,为临床动物螨病防治提供新型安全有效药物治疗奠定

了试验依据。

1 材 料

1.1 药品与试剂 苦参、百部、大风子、蛇床子、老鹳草均购自北京同仁堂药业公司;硬脂酸、单甘脂、凡士林、羊毛脂、液状石蜡、氮酮、甘油、三乙醇胺、尼铂金乙酯、丁二醇均购自山东优索化工科技有限公司;无水乙醇购自天津大茂化学试剂厂。

1.2 实验动物 选取健康兔只 16 只,雌雄各半,体重 (2.5 ± 0.2) Kg;豚鼠 6 只,雌雄各半,体重 (250 ± 30) g,均由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.3 实验仪器 磁力搅拌器购自上海医械机厂;旋转蒸发仪购自北京莱博泰仪器股份有限公司;纯水仪购自华创有限公司;电子恒温水浴锅购自力辰科技有限公司;电子天平购自上海蒲春有限公司。

2 制备方法

2.1 中药组方比例 前期通过正交试验数据分析,在中药组方比例为大风子:百部:苦参:蛇床子:老鹳草 1:1:1:1:1(低比例组),1:2:2:2:2(中比例组),1:2:2:3:3(高比例组)时,药物浸膏得出率最高,成分析出值最大,且无毒性。通过将三组比例在临床感染疥螨兔上分组治疗比较,发现按照大风子 10 份,苦参、百部 20 份,蛇床子、老鹳草 30 份的组方,临床疗效最佳,皮肤愈合快,具有较高安全性。具体数据见下表 1。

表 1 复方制剂不同比例对兔疥螨病临床治疗效果对比试验结果

Tab 1 Comparative test results of different ratios of compound preparations in the clinical treatment of rabbit scabies

组别	治愈数/只	治愈率/%	治愈时间/d
低比例组(第Ⅰ组)	2	50	23
中比例组(第Ⅱ组)	3	75	19.3
高比例组(第Ⅲ组)	3	75	15.7
空白对照组(第Ⅳ组)	0	0	0

备注:1. 治疗方案为:制剂组用配制制剂喷洒患处,3 次/d,连用 4 w;空白对照组用生理盐水喷洒患处,3 次/d,连用 4 w。2. 免疥螨病的治愈标准:免瘙痒症状消失,结痂脱落,新毛长出。同时观察动物有无红肿,脱毛等刺激性反应和流涎、食欲不振、抽搐等毒性反应,观察复方制剂安全性。

2.2 中药浸膏制备 将五种中药按照组方称取,分别打成粉,过 40 目筛,将苦参、百部、老鸛草浸泡于蒸馏水中 4 h,而大风子、蛇床子具有挥发油成分,浸泡于乙醇中更利于成分析出,分别浸泡于 65 % 乙醇中 4 h。按 1:1 比例分别稀释煎煮 3 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,用 1 倍量无水乙醇,水提

醇沉,静置过夜。待分层后,取其上清液,置于旋转蒸发仪上,85 ℃ 浓缩至半流体稠膏(50%),然后将半流体稠膏置于 80 ℃ 水浴锅中加热至稠膏。稠膏性状以玻棒取浓缩药液滴于干燥牛皮纸上,滴膏呈现珠状,不扩散。测定相对密度为 1.2 ~ 1.3 g/mL。具体中药浸膏制备方法见图 1。

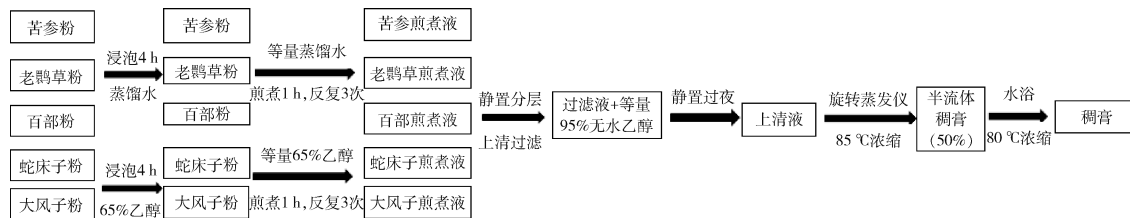


图 1 中药成分提取流程图

Fig 1 Flowchart of extracting traditional Chinese medicine ingredients

2.3 中药软膏剂基质制备 制备中药浸膏成分分析,油类成分较重,故癣螨灵软膏采用 O/W 剂型作为基质。按文献方法^[5]称取硬脂酸 120 g、单甘脂 35 g、凡士林 25 g、羊毛脂 60 g、液状石蜡 60 g、水溶性氮酮 20 mL(2%)、甘油 35 g 作为油相,三乙醇胺 4 g、尼铂金乙酯 1 g、丁二醇 70 mL(7%),1000 mL 蒸馏水作为水相。将油相成分混合置于容器内,水浴加热至完全融化,并于水浴锅 70 ℃ 内保温;将三乙醇胺、尼铂金乙酯、丁二醇加入蒸馏水中,加热至完全溶解。将水相缓慢倒入油相中、用磁力搅拌器搅拌均匀直至冷凝,置于冰箱 5 ℃ 冷藏备用。

2.4 中药软膏剂处方 称取中药浸膏 25.0 g,软膏剂基质 100 g 作为软膏比例。将软膏剂基质取出,80 ℃ 水浴融化,搅拌均匀后加入中药浸膏,边加边玻棒搅拌,至乳化完全,放置常温凝固即得。

3 质量检测评价

3.1 稳定性检查

3.1.1 离心试验 将中药软膏剂放入离心管中,3000 r/min 离心 30 min 后,取出观察有无分层及破乳现象。

3.1.2 耐寒试验 将中药软膏剂置于离心管内,置于 -20 ℃ 冰箱 24 h 后,观察有无分层破乳以及色泽、均匀性改变等现象。

3.1.3 耐热试验 将中药软膏剂置于离心管内,

置于 50 ℃ 恒温箱 6 h,观察有无分层破乳、霉败以及色泽、均匀性改变等现象。

3.1.4 加速试验 将中药软膏剂装入器皿内,置于温度(45 ± 2)℃、相对湿度为 75% 的恒温培养箱中,连续放置 3 个月,定期考察、观察有无分层破乳、霉败以及色泽、均匀性改变等现象。

3.1.5 pH 值检查 抽取中药软膏剂,用 pH 酸度计测定酸碱值。

3.1.6 粒度检查 将软膏剂在玻片上涂抹薄片,置于显微镜下观察。

3.2 中药软膏剂安全性研究 取体重(2.5 ± 0.2) Kg 白色健康家兔 16 只,雌雄各半,分为空白对照组 1、空白对照组 2、完整皮肤给药组、破损皮肤给药组。每组家兔耳部及颈部舔不到区域除毛,空白对照组 2 和破损皮肤组家兔在除毛区域用一次性刀片钝性刮破表皮组织,直至轻微渗血为止。每组家兔脱毛区均匀涂抹中药软膏剂,每天涂药 2 次,每次涂抹 1 g。空白对照组 1 和 2 涂生理盐水 2 mL 作为阴性对照,并分笼饲养,连续用药 7 d,并在除去药物后 48 h 内观察皮肤有无红斑和水肿现象,按照表 2 进行强度刺激、过敏和毒副反应评价^[6]。

同时,实验开始及结束 24 h 内,1 周后分别称取每组家兔体重,分析不同组增重情况,主要公式如下:a. 平均日增重(g) = (实验末平均体重 - 实验

初平均体重)/实验天数。

表 2 皮肤刺激及毒副反应评价表

Tab 2 Evaluation of skin irritation and side effects

强度刺激	皮肤反应		毒副反应	全身症状					
	充血	水肿		食欲	饮欲	精神	呕吐	抽搐	粪尿情况
无刺激	无充血	无水肿	无	正常	正常	正常	无	无	正常
轻度刺激	勉强可见充血	勉强可见水肿	轻度	降低	增加	正常	无	无	增加
中度刺激	明显充血	水肿隆起轮廓清楚	中度	不振或抑制	不振	萎靡或亢奋	口角被毛潮湿	无	增加,轻度腹泻
重度刺激	中等到严重充血	水肿隆起约 1 cm	重度	废绝	废绝	昏迷	流涎	有	重度腹泻
强刺激	黄色色斑有焦	水肿隆起超过 1 cm	强	-	-	休克	呕吐	有	失禁

4 结果与分析

4.1 稳定性试验结果 由表 3 和图 2 可知,本品外观性状为浅棕色,质地细腻,手感良好,易于推开和涂抹,稳定性良好,镜检下未见大颗粒存在。基本符合《中华人民共和国兽药典》(2015 版)有关软膏项的要求。

表 3 软膏剂质量标准分析表

Tab 3 Ointment quality standard analysis

试验	结果	试验	结果
离心试验	均匀	耐热试验	未分层
耐寒试验	无破乳	加速试验	无霉败
PH 值	6.9	粒度检查	< 180 μm



图 2 癣螨灵软膏稳定性实验结果图

Fig 2 Test results of the stability of Xian Manling ointment

4.2 动物安全性试验结果 刺激性试验结果:完整皮肤给药组受试兔未见充血和水肿,破损皮肤给药组受试兔皮肤未出现水肿,仅表现出轻微红斑,红斑在 6 h 内均消退。

毒副作用结果:在试验 1 周内,受试兔精神良好,采食、尿液及粪便均正常,未见中毒或异常症状。

日增重结果:用药 1 周内,四组家兔体重变化均不显著 ($P > 0.05$),且停药一周后,每组家兔体重没有下降。

5 讨论与结论

螨病通过接触传播,常引起畜禽大批量发病,甚至引起大面积死亡,严重影响畜牧业的健康发展。目前螨病的疫苗仍处于研究阶段,药物防治螨

病仍是主要方式^[7]。化学类药物如有机磷类、拟除虫菊酯类药物有一定治疗效果,但这些药物本身对动物有较大毒性。而抗生素类药物如伊维菌素、多拉菌素等,化学稳定性强,很难被分解,长时间残留在畜产品中,会导致动物及消费者食物中毒^[8]。因此筛选具有杀螨活性的天然药物,并进一步制成外用制剂,表现出较高研究价值。

本软膏剂组方经过前期筛选^[9]和离体驱螨实验观察^[10],所萃取的大风子液、苦参液、百部液、蛇床子液及混合液对离体螨虫均有一定杀灭作用,表明该制剂组方切实可行。在此基础上,加入活血为主的老鹳草,具有活血生肌及促进创面早日愈合功效,通过前期动物实验确定药物组成比例,所组结果表明,该中药混合液的临床疗效治愈率高,皮肤损伤愈合良好,确有临床疗效,但治愈率仍然未达到 80% 以上,且治愈所需时间较长,仍需进一步优化制备工艺以提升临床疗效。

鉴于在临床生产中使用喷剂耗费时间较多,且每日需用药 3 ~ 5 次,不利于在规模化畜禽养殖生产中使用,本研究利用羊毛脂和凡士林制作软膏剂,具有润泽保湿作用,减少创面刺激和维持创面安静,有利于创面愈合。本试验中软膏剂由中药萃取液和适当基质混合而成。基质为软膏的赋形剂,对软膏的质量和疗效发挥都具有重要影响^[11]。软膏基质分为水溶性、油脂性和乳剂型基质^[12]。本研究根据癬螨灵的主要药物成分及适应证以及根据前期基质筛选,最终选择乳剂中 O/W 剂型作为选择基质。

中药制剂虽有相对安全性,但中药成分十分复杂,部分成分可能引发过敏或毒副作用^[13]。而软膏剂作为外用制剂,临床用药前毒理学评价主要考察其对皮肤刺激性^[14]。但癬螨灵主要针对螨虫病例,螨虫感染临床典型病变就是皮肤破溃,结痂。因此,本试验中考虑到软膏剂涂敷皮肤破溃处,是否会从皮肤破溃处大量进入血液出现全身毒副作用,故通过构建家兔的皮肤破损模型,确定了各试验组家兔体重变化组间对比不显著,全身症状无异常,未出现毒性反应;同时,皮肤测试结果,只有破

损皮肤组有轻微刺激表现,但在 6 h 内消退完全,与文献报告破损皮肤使用外用制剂的轻微刺激表现相一致^[15]。由此可知,癬螨灵软膏剂具有较好的稳定性,良好的安全性,无明显毒副反应,具有深入研发前景。

参考文献:

- [1] 杨茂生. 贵州省山羊蠕形螨病流行病学调查[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(3): 16 - 17.
Yang M Sh. Epidemiological survey of goat demodex in Guizhou Province[J]. Chinese Journal Of Veterinary Science And Technology, 2002, 32(3): 16 - 17.
- [2] S Rehbein, M Visser, M Meyer, *et al.* Ivermectin treatment of bovine psoroptic mange: effects on serum chemistry, hematology, organ weights, and leather quality[J]. Parasitology Research, 2015, 114(2): 535 - 542.
- [3] 刘钟杰, 许剑琴. 中兽医学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003. 448.
Liu Zh J, Xu J Q. Traditional Chinese Veterinary Medicine[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003. 448.
- [4] 鲍燕. 宋以前中医皮肤病史研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
Bao Y. Research in the dermatological history of Chinese Medicine before the Song dynasty[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2013.
- [5] 李思琪. 中兽医治疗动物螨病的临床应用研究进展[J]. 湖北畜牧兽医, 2019, 40(5): 19 - 20.
Li S Q. Research progress in clinical application of Chinese veterinary medicine in the treatment of animal mite disease[J]. Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2019, 40(5): 19 - 20.
- [6] 吴海港, 刘锦妮, 徐光科, 等. 防治犬真菌性皮肤病中药软膏剂的制备及质量评价[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(5): 52 - 56.
Wu HG, Liu JN, Xu GK, *et al.* Preparation and quality control of prepared traditional chinese herbal medicines ointment for canine dermatomycosis[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(5): 52 - 56.
- [7] Anjia Joachim. Vaccination against parasites - status quo and the way forward[J]. Porcine Health Management, 2016, 74(2): 30.
- [8] 王满定, 白波, 负佳成, 等. 畜禽螨病防治研究[J]. 畜牧兽医学, 2019, 80(3): 1 - 4.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.12.9

犬细小病毒 YA-16-C66 株纸片载体培养工艺优化及其与转瓶培养工艺的比较分析

朱明媛,刘静,李艳玲,董建伟,黄韬,李润*

(唐山怡安生物工程有限公司,河北唐山 063020)

[收稿日期] 2020-07-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 12-0049-07 [中图分类号] S852.6

[摘要] 采用微型生物反应器确定纸片载体上 F81 细胞最佳的接种密度和最佳接毒剂量,在 NBS 反应器中验证温度对犬细小病毒 YA-16-C66 株增殖的影响。经过三次重复试验,确定利用 NBS 生物反应器培养犬细小病毒 YA-16-C66 株最佳工艺为:采用同步接毒法,培养基为含 1% 新生牛血清的 199 溶液,细胞接种密度为 $1.5 \times 10^7/\text{g}$,接毒剂量为 0.05 MOI,在 pH 7.2 条件下,37.0 °C 培养 48 h 后降温到 35.0 °C 继续培养 72 h,细胞病变达到 80%~90% 时收获上清液。三批次反应器与转瓶工艺产品比较结果表明:反应器比转瓶收获液病毒含量高 $10^{1.1} \sim 10^{1.9} \text{ TCID}_{50}/100\mu\text{L}$; 相同培养面积,反应器所得病毒总量是转瓶所得病毒总量的 2.8~18.5 倍;相同抗原含量的灭活苗,反应器与转瓶工艺产品无显著性差异,血凝抑制效价均 ≥ 896 。

[关键词] 犬细小病毒;生物反应器;纸片载体;转瓶;培养工艺

基金项目: 河北省重点研发计划自筹项目(18222411)

作者简介: 朱明媛,硕士,从事动物疫苗开发工作。

通讯作者: 李润。E-mail:lr@yan-bio.cn

Wang MD, Bai B, Yun JCh, *et al.* Study on the control of mite disease in livestock and poultry[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Science*, 2019, 80(3): 1-4.

[9] 杨海燕,张传美,单虎. 11 种中药对犬螨虫病的治疗效果观察[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, 50(16): 109-110.

Yang HY, Zhang CM, Shan H. Observation on the effect of 11 kinds of traditional Chinese medicine on dog mites[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013, 50(16): 109-110.

[10] 巩忠福,杨国林,王建华,等. 19 种植物提取物的杀螨活性观察[J]. *中国兽药杂志*, 2002, 36(1): 6-8.

Gong ZhF, Yang GL, Wang JH, *et al.* In vitro acaricidal effect of 19 plant extracts on psoroptic mange[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2002, 36(1): 6-8.

[11] 华海婴,归振华,乔淑会,等. 紫苏醇软膏的制备及其体外经皮渗透研究[J]. *中草药*, 2013, 44(14): 1911-1917.

Hua HY, Gui ZhH, Qiao NH, *et al.* Study on the preparation of perillyl alcohol ointment and its percutaneous penetration *in vitro* [J]. *Chinese herbal medicine*, 2013, 44(14): 1911-1917.

[12] 李幸,高静,吕俭霞,等. 猪肤汤软膏制备工艺研究[J]. *亚太*

传统医药, 2018, 14(10): 51-54.

Li X, Gao J, Lu JX, *et al.* Study on the preparation technology of Zhufutang ointment [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2018, 14(10): 51-54.

[13] 黄芝瑛. 中药新药一般毒理试验及评价[J]. *药品评价*, 2004, 11(1): 50-52.

Huang Zhiying. General Toxicology Test and Evaluation of New Chinese Medicine[J]. *Drug Evaluation*, 2004, 11(1): 50-52.

[14] 顾亚凤. 蝇蛆油对实验动物皮肤的刺激性、过敏性及烫伤治疗药效研究[J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(10): 16-17, 38.

Gu YF. Effects of grease of housefly larva on toxicology-physiology and pharmacology in experimental animals[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2004, 38(10): 16-17, 38.

[15] 马琪. 犬皮肤真菌病治疗药物的筛选与治疗疗效试验[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.

Ma Q. Selection and clinical trial of the treatment pharmaceuticals for canine dermatomycosis[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.

(编辑:陈希)