

参考文献:

- [1] 贾杏林,齐长明. 奶牛子宫内膜炎研究进展[J]. 中国兽医杂志,2005,41(2):34-36.
- [2] Jozef Nagy, Jaroslav Hajurka, Hanna Rozanska, et al. Tetracycline residues in cow milk after intrauterine administration[J]. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2001,45(2):367-371.
- [3] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学(第3版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:911.
- [4] 郑建华,吴春福,刘雯,等. 清音丸抗炎镇痛作用研究[J]. 中药药理与临床,2002,18(6):7-11.

- [5] 何慧琴,丁淑华. 眼底I号方对小鼠毛细血管通透性的影响[J]. 中医药通报,2002(2):5152.
- [6] 朱社敏,柴秀娟,匡荣. 复方大青叶合剂主要药效学研究[J]. 中成药,2004,26(11):909-913.
- [7] 李灿东,王瑞同,杜建,等. 固表解毒合剂对大鼠棉球肉芽肿形成的影响[J]. 福建中医学院学报,2006,16(2):25-27.
- [8] 姜巍. 清官液II号的抗炎机理及临床药效学研究[D]. 兰州:中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,2005.
- [9] 刘钟杰,许剑琴. 中兽医学[M]. 北京:中国农业出版社,2002:239.

改良地胆头注射液的试制及其质量检测

陈进军¹, 聂芳红², 刘勇¹, 林红英¹, 范焕芳¹, 黄秋滢¹, 张继东¹

(1. 广东海洋大学农学院动物医学系, 广东湛江 524088; 2. 广东海洋大学食品科技学院)

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2009)02-0047-03

地胆头(*Elephantopus scaber* L.)又名苦地胆、地胆草、天芥菜、鸡疳粘(《本草纲目》)、土公英、土紫胡、草鞋底等,为菊科植物地胆草属。分布于我国东南至西南部各省,尤其是广东、广西、福建等地多见,生长于路边、林缘或者空旷草地上;味苦性凉。药用全草^[1,2],有清热解毒、凉血消肿等功效。现代药学研究表明,地胆头含有甾醇以及菊糖、果糖、氨基酸和内酯等化学成分,其主要有效成分为地胆头内酯。地胆草的重要化学成分是倍半萜内酯,全草中分离到的倍半萜内酯成分有两种类型。一是牻牛儿内酯型^[3,4],包括地胆草内酯(elephantopin)、去氧地胆草内酯(deoxyelephantopin)、异去氧地胆草内酯(isodeoxyelephantopin)、地胆草种内酯(scabertopin)和11 β ,13-二氢去氧地胆草内酯(11 β ,13-dihydrodeoxyelephantopin);二是愈创木内酯型^[5],此类型目前仅从地胆草中分离出3种,即去酰蓟苦素(deacylcyanaropicrin)、葡萄糖中美菊素(glucosazulazain)C和还阳参苷(crepiside)E。本实验室试制地胆头注射液对金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌均有明显的抑制作用^[6]。但引入微波-超声提取技术,添加一定量的磺胺增效剂,可能更有利于保留地胆头有效成分,增加其抗菌效果。笔者等以65%乙醇为溶剂,结合中草药提取纯化新技术超声-微波辅助提取,添加一定量的磺胺增效剂,制成改良地胆头注射液,并对其质量和安全性进行了检查,为改良地胆头注射液的临床效果研究奠定基础。

1 材料与方法

收稿日期:2008-10-30

项目来源:广东省湛江市科技招标项目(湛科[2006]94号)

作者简介:陈进军(1967-),男,教授,博士,主要从事中草药现代化及动物毒理学研究。E-mail:jjchen777@yahoo.com.cn

1.1 地胆头

2008年6月采自广东湛江市麻章区,经广东海洋大学农业生物研究所鉴定为菊科地胆草属多年生草本植物地胆草。全草阴干,粉碎,过20目筛,收集地胆草粉末,储藏于阴凉干燥处备用。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂 无水乙醇、亚硫酸钠、碳酸氢钠、活性炭、乙醚、乙醇、氨水、氯仿、甲醇、注射用水、羧甲基纤维素钠、硅胶G、磺基水杨酸、鞣酸试剂、醋酸、氯化钠、明胶、氯化钙,均为国产分析纯试剂。注射用葡萄糖、生理盐水、普通肉汤培养基、普通琼脂培养基,购自广东利泰药业有限公司,批号:2007060816。金黄色葡萄球菌购自中国兽医药品监察所。

1.2.2 仪器 数显电热培养箱:HPX-9272ME,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;电热恒温水槽:SSW,上海博迅实业有限公司;500 μ L的微量移液器:WKY,上海求精生化试剂仪器有限公司;电子分析天平:AY120,日本岛津电子科技有限公司;三用紫外分析仪:WFH-20S;离心机及离心管:TDL80-2B,上海安亭科学仪器厂制造;手提式压力蒸汽灭菌器:YXQ-SG46-280A,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;微波炉:LGWD700(MG-5061T),天津乐金电子电器有限公司;双频数控超声波清洗器:KQ-300VDE型,昆山市超声仪器有限公司;数显不锈钢鼓风干燥箱:GZX-9240 MBE,上海博迅实业有限公司;净化工作台:SSW-CT-2F,上海跃进医疗器械厂。

1.3 试验动物

健康家兔3只,体重1.5-2.5 kg,购于广东医学院实验动物中心。试验前一周购买,使其适应试验环境。

1.4 地胆头的加工

采集地胆头全草3-5 kg,用水洗涤除去沙粒、泥土等杂

质(此过程最大限度不损伤地胆草的根、茎、叶),阴干,并置鼓风干燥箱中 50℃ 辅助干燥,粉碎过 20 目筛,装入密闭的塑胶袋中 4℃ 冷藏备用。分别于采集后、粉碎前、粉碎后称重,计算地胆草的失水率和收粉率。

1.5 地胆头原液的制备

取地胆头粉末 300 g,加入 65% 乙醇至 3 000 mL 浸泡 12 h,每隔 2 h 用玻璃棒搅拌 5 min,超声(240 W,30℃,28 kHz)处理 20 min,微波处理 2 min(100 mL/30 s),后于 60℃ 加热回流浸提 4 h,收集浸提液,将浸提液趁热过滤,收集滤渣重复上述操作,合并滤液,调 pH 值至 8,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,于通风橱内 60℃ 水浴加热浓缩为糖浆状,向浓缩液中加入适量的 2% 亚硫酸钠和 2% 碳酸氢钠溶液,然后按 1% 比例加入活性炭,搅拌,静置 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,过滤得上清液,用乙醚萃取 3 次。60℃ 水浴加热挥去乙醚,4℃ 冷藏 6 h,过滤,如此重复 2 次,然后调 pH 值至 8,浓缩至原液体积的 1/2。在上述制备过程中,按试管法监测提取液中的内酯、黄酮类化合物。

1.6 改良地胆头注射液的配制

按 2.5% 比例于地胆头原液加注射用葡萄糖粉,用双蒸水稀释至适当体积,65℃ 水浴上搅拌,放置 30 min,过滤。按 20 mg/mL 加入甲氧苄啶(TMP),然后按总量的 0.5% ~ 1.0% 加入吐温-80 以增加主药的溶解度,调 pH 值至 6.8,搅拌,静置 30 min,过滤,定容至适当体积,流通蒸气灭菌 30 min,无菌封装(每支 5 mL),即得改良地胆头注射液。

1.7 改良地胆头注射液质量检测

1.7.1 改良地胆头注射液的漏气检查 封装、灭菌后趁热放入洁净冷水中,如有漏气的安瓿即会充入冷水,药液颜色变淡、量增加,即可检出。

1.7.2 pH 值检测 用精密 pH 值试纸测试改良地胆头注射液的 pH 值,应在 6.0~8.0 之间。

1.7.3 装量检测 取供试品注射液 5 支,开启时要注意避免损失,将内容物倾入经校正的干燥量筒中,倒立,让内容物倾净。读出每支内容物的装量,并求出平均装量值。应该符合平均装量比少于标示装量,每支装量不少于标示装量的 93%;如有 1 支装量不符合规定,则另取 5 支复试,均应符合规定。

1.7.4 澄明度检测 在 30 W 荧光灯下,以白色为背景,距 20 cm 处观察有无异物。

1.7.5 杂质检测 蛋白质:取地胆头注射液 1 mL,加新配制的 30% 磺基水杨酸溶液 1 mL,混匀,放置 5 min,不得出现沉淀。注射液中如含有遇酸能产生沉淀的成分,可以改加鞣酸试剂 1~2 滴,不得出现浑浊和沉淀。鞣质:取注射液 1 mL,加入稀醋酸 1 滴,再加明胶氯化钠溶液 4~5 滴,不得出现浑浊或沉淀。草酸:取溶液型静脉注射液适量,用稀盐酸调节 pH 值至 1~2,滤过,取滤液 2 mL,滤液调节 pH 值至 5~6,加 3% 氯化钙溶液 2~3 滴,放置 10 min,不得出现浑浊或沉淀。

1.7.6 有效成分检测 黄酮类物质的监测:在试管中加

入 1 mL 地胆头注射液,用无水乙醇稀释至适当体积,后在试管中加 1~2 滴三氯化铁溶液,观察颜色变化。地胆头内酯的监测:在试管中加入 1 mL 地胆头注射液,将其加热,后趁热加入适量 NaOH,边加边摇,观察颜色变化。薄层色谱法对地胆头内酯的监测:硅胶 G 薄板为载体,氯仿:甲醇:氨水(25:3:1)为展开剂,展开,取出,晾干后,于紫外灯(365 nm)下检测。

1.7.7 溶血试验 取 10 mL 试管 6 支,按表 1 配比量依次加入 2% 红细胞悬液和生理盐水,混匀后,于 37℃ 恒温箱放置 30 min,然后分别加入不同量注射液(第 6 管为对照管),摇匀后置 37℃ 恒温箱中。开始每隔 15 min 观察 1 次,1 h 后,每隔 1 h 观察 1 次,共观察 4 h。按文献^[6]方法判定是否出现溶血现象。

表 1 改良地胆头注射液溶血性试验方法/mL

试管号	1	2	3	4	5	6
注射液	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0
生理盐水	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	2.5
2% 红细胞悬液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

1.7.8 热原检测 兔耳静脉注射药液,观察家兔体温变化情况,以判定供试品中所含热原是否符合规定。取健康家兔 3 只,实验前测定其正常温度,在测定后 15 min 内按 1 mL/kg 自兔耳缘静脉缓慢注入一定量预热的注射液,后每隔 1 h 测量体温 1 次,共测 3 次,以 3 次中体温最高的 1 次减去正常体温为体温升高值,若体温升高值均小于 0.6℃,并且总升高小于 1.4,则认为该供试品的热原符合规定。

1.7.9 无菌检测 试验前将所有仪器、普通肉汤和琼脂培养基分装,进行高压灭菌。试验时取注射液 4 支,加入 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释至 100 mL,通过装有孔径为 0.25 μm 的薄膜过滤器。然后把滤膜分为 4 等份,分别放在普通肉汤和普通琼脂培养基中,再取 1 份接种金黄色葡萄球菌接种作为对照组,在 37℃ 的培养箱中培养 24 h 后观察。

2 试验结果

2.1 封装、漏气检测

改良地胆头注射液的安瓿均无漏气现象,封装合格。

2.2 澄明度检测

在 30 W 荧光灯下,以白色为背景,距 20 cm 处观察到无异物,颜色成棕黄色,表明地胆头注射液清澈无杂质,澄明度较好。

2.3 装量检测

检查发现,5 支改良地胆头注射液的平均装量为 5.002 mL,符合要求。

2.4 pH 值检测

测得改良地胆头注射液的 pH 值为 6.8,在 6.0~8.0 之间,符合要求。

2.5 有效成分检测

三氯化铁法变化呈黄色,说明地胆头注射液中含有黄酮类物质。热氢氧化钠法变化呈黄色,说明地胆头注射液中含有内酯类物质。薄层色谱法监测,可见薄板上呈现了 4 个淡

蓝色的斑点,判定其含有地胆头内酯。

2.6 杂质检测

30% 磺基水杨酸法反应发现,地胆头注射液放置 5 min 后未出现浑浊,说明蛋白质检查为阴性。稀醋酸-明胶氯化钠溶液检查,未出现浑浊或沉淀,说明鞣质检查为阴性。稀盐酸-氯化钙溶液检查,未出现浑浊或沉淀,说明草酸检查为阴性。

2.7 热原检测

兔耳静脉注射药液,观察家兔体温变化情况,发现体温升高值均小于 0.6℃,并且总升高小于 1.4,故该注射液的热原符合规定。

2.8 无菌检测

琼脂扩散试验表明,改良地胆头注射液经 37℃、培养 24 h 后,均无菌落生长,判为无菌。

2.9 溶血检测

溶血试验结果表明,改良地胆头注射液溶血试验检查合格。

3 讨论与分析

中药注射液是提取中草药有效成分并去除杂质部分制成的新剂型,提取其有效成分是最为重要的工序,传统的提取纯化方法所制备的药液已不能达到现今注射液的质量要求,一些新的分离提纯技术不断涌现,膜分离技术、吸附分离、酶反应技术、新型吸附澄清技术、超临界流体萃取技术、高速逆流色谱技术、强化浸取技术以及微波-超声波辅助提取技术等一些新技术正有淘汰传统的煎煮、浸渍、渗漉等工艺的趋势^[2,7]。

地胆头注射液在制备中针对关键的不同成分的理化性质和药理特性,制定出最佳的提取与纯化手段^[6]。本试验在地胆头化学成分、药理学、临床应用和地胆头注射液试制等的基础上,用 65% 的乙醇对粉碎的地胆头充分浸泡,并利用超声-微波辅助提取,大大提高了有效成分地胆头内酯和黄酮类物质提取效率,经过萃取、过滤、活性炭处理等多个步骤进行纯化,制成改良地胆头注射液,经规范进行质量分析,符合质量标准的中药注射液。另外,该改良地胆头注射液添加了磺胺增效剂 TMP,其体内抗菌效果尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社,1977:1291-1292.
- [2] 梁俏而, 陶知大. 地胆草属植物化学成分与药理活性[J]. 国外医学·植物药分册, 2002, 17(1): 8-9.
- [3] Paul P B, Hon P M, Cao H, et al. Sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber* [J]. Phytochem, 1997, 44(1): 113-117.
- [4] De Silva L B, Herath W, Jennings R C. A new sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber* [J]. Phytochem, 1982, 21(5): 1173-1175.
- [5] Hisham A, Pieters L, Claeys M, et al. Guaianolide glucosides from *Elephantopus scaber* [J]. Planta Med, 1992, 58: 474-475.
- [6] 陈进军, 邓秀章. 地胆头注射液的试制及安全性试验[J]. 中兽医医药杂志, 2005, 24(6): 40-41.
- [7] 徐晓彬. 千里光抗菌有效部位药理作用的初步研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2007.

宫康对山羊子宫内膜炎的药效试验

王 瑜^{1,2}, 苗小楼², 杨耀光², 苏 鹏², 潘 虎², 焦增华², 张兆旺¹

(1. 甘肃农业大学, 甘肃兰州 730070; 2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所)

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2009)02-0049-02

子宫内膜炎是常见的母羊生殖系统疾病,也是导致母羊不孕的重要因素之一^[1-3]。母羊分娩过程中病原微生物通过产道侵入子宫,或由于配种、人工授精及人工助产过程中消毒不严,尤其是在发生难产时不正确的助产、胎衣不下、子宫脱出、阴道脱出、胎死腹中等,均易导致感染而引起子宫内膜炎。笔者等根据中兽医学理论,研制出奶牛子宫内膜炎治疗药宫康,经临床试验和多个奶牛场推广应用证明,其对奶牛子宫内膜炎有显著疗效。为了扩大该药的应用范围,笔者等采集患子宫内膜炎山羊的子宫分泌物进行病原菌分离

和鉴定,以液体培养基倍比稀释法测定宫康对山羊子宫内膜炎主要病原菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC),并用宫康对患病山羊进行治疗,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选自甘肃省临夏州农户散养的病羊 51 只。

1.2 培养基

肠杆菌科细菌生化编码微量鉴定管(GYZ-15e)、麦康凯琼脂培养基:购自中国兽药监察所;营养肉汤、营养琼脂培养基:购自杭州微生物试剂厂;却浦曼琼脂、改良艾德华琼脂、血琼脂、血清肉汤培养基:按文献^[4,5]方法配制。

1.3 细菌学检查

1.3.1 病料采集 将病羊外阴部洗净消毒,用灭菌输精管插入子宫腔,注入生理盐水 10 mL,并立即回抽,将采集病料移入灭菌试管内,低温保存待检。

收稿日期: 2009-02-18

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(项目编号: 111000402); 兰州市科技局农业攻关及产业化(项目编号: 2008-1-179)

作者简介: 王 瑜(1974-),男,在读硕士,助研,研究方向: 兽药研究与开发。