

复方呋喃西林纳米乳的制备及其对奶牛 子宫内膜炎的疗效观察

胡 玥, 欧阳五庆, 孙江才, 王筱霏, 赵旭东

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研制复方呋喃西林纳米乳,并检测其对奶牛子宫内膜炎的治疗效果。【方法】用紫外分光光度计测定呋喃西林在 3 种油相(肉豆蔻酸异丙酯(IPM)、橄榄油、石蜡油)和 2 种表面活性剂(聚氧乙烯醚化蓖麻油(RH40)、Tween-80)中的溶解度,确定纳米乳处方。采用转相乳化法制备复方呋喃西林纳米乳,对其进行质量评价,并研究其对西安和北京 2 个奶牛场子宫内膜炎病牛的治疗效果。【结果】复方呋喃西林纳米乳的配方是:呋喃西林 1%,替硝唑 0.3%,Tween-80 32.5%,Span-80 13.7%,橄榄油 5%,蒸馏水 47.5%(各组份含量均为质量分数)。用该配方制备的复方呋喃西林纳米乳为 O/W 型,乳滴呈球形,分布均匀,无粘连,平均粒径为 67.20 nm,乳液澄清透明,避光保存时稳定性较好。复方呋喃西林纳米乳对西安某奶牛场子宫内膜炎病牛的治愈率为 92.9%,较清宫液对照组高 7.2%;有效率为 92.9%,与清宫液治疗组相同。复方呋喃西林纳米乳对北京某奶牛场子宫内膜炎病牛的治愈率为 66.7%,有效率为 77.8%,均极显著高于宫速清溶液($P < 0.01$)。【结论】复方呋喃西林纳米乳研制成功,其对奶牛子宫内膜炎有较好的治疗效果。

【关键词】 呋喃西林;复方纳米乳;奶牛子宫内膜炎

【中图分类号】 S859.79⁺6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)09-0018-05

Preparation of compound furacilin nanoemulsion and its clinic therapeutic effect on bovine endometritis

HU Yue, OUYANG Wu-qing, SUN Jiang-cai, WANG Xiao-fei, ZHAO Xu-dong

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Compound furacilin nanoemulsion was prepared to invest its clinic therapeutic effect on the bovine endometritis. 【Method】The solubility of furanillin was measured respectively by UV spectrophotometer in three kinds of oils (IPM, olive oil, liquid paraffin) and two kinds of surfactant (RH40, Tween-80), and then the optimal formulation was screened. Compound furacilin nanoemulsion was prepared by phase inversion emulsification and its quality was evaluated, and its clinic therapeutic effect on the bovine endometritis was studied. 【Result】Compound furacilin nanoemulsion could be prepared with furacilin 1%, tinidazole 0.3%, Tween-80 32.5%, Span-80 13.7%, olive oil 5%, and distilled water 47.5% (content of each constituent is quality fraction). The nanoemulsion was the type of oil-in-water and transparent and uniform, nanoemulsion drop was spherical, well-distributed, no conglutinate with mean diameter 67.20 nm. Its stability was good when stored without light. Clinical test on cows with endometritis showed that the cure rate was 92.9%, 7.2% higher than that of Qinggongye in control group, the effective rate being 92.9%, the same as Qinggongye in a dairy farm in Xi'an, and for that in Beijing the cure rate was

* [收稿日期] 2008-12-16

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAD04A11);大学生创新性实验计划项目(071601004)

[作者简介] 胡 玥(1987—),女,山西大同人,在读本科生,主要从事细胞生物学研究。E-mail: shelley4@163.com

[通信作者] 欧阳五庆(1960—),男,陕西凤翔人,教授,博士生导师,主要从事纳米药物研究。E-mail: oywq506@sina.com

66.7% with the effective rate being 77.8%. The two values were significantly higher than that of GongSu-qing in the control group respectively ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Compound furacilin nanoemulsion is prepared successfully, and the clinic therapeutic effect on the bovine endometritis is better.

Key words: furacilin; compound nanoemulsion; bovine endometritis

子宫内膜炎是奶牛的常见病,发病率较高,可导致奶牛屡配不孕(占不孕症的60%~92%)、产奶量下降、淘汰率增大、治疗费用增加和药物治疗期间牛奶废弃,给奶牛生产带来了巨大的经济损失。目前,如何有效的治疗该病仍是奶牛养殖业迫切需要解决的关键问题。呋喃西林(Furacilin)是兽医临床常用的一种治疗子宫内膜炎的局部抗菌药物^[1-2],但其具有水溶性差,见光易分解,低温易析出,对厌氧菌作用效果差等缺点^[3-4],因此临床应用效果往往不理想,急需提高其药效。

纳米乳是由表面活性剂、助表面活性剂、油相和水组成的透明或半透明、粒径1~100 nm、各向同性的热力学稳定体系,具有可提高难溶性药物在水中的溶解度、增强药物稳定性、提高药物生物利用度以及改变药物在体内分布、实现靶向释药、降低用药次数和剂量等优点^[5-7]。近年来,作为一种理想的新型药物载体,纳米乳已被广泛应用于难溶性药物新剂型的研发,并显示出广阔的应用前景。但目前尚未见有关复方呋喃西林纳米乳研制的报道。本试验将呋喃西林与替硝唑和雌二醇配伍,通过转相乳化法制备复方呋喃西林纳米乳,考察其对奶牛子宫内膜炎的治疗效果,以期对奶牛子宫内膜炎的治疗提供一种高效安全的新型纳米级药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 SPECORD50 紫外分光光度计,德国 Jena 分析仪器股份公司生产;JEM-1230 透射电镜,日本电子公司生产;Nicomp388/ZetaPALS 激光粒度测定仪,英国马尔文公司生产。

1.1.2 主要试剂 呋喃西林原料药,苏州第五制药有限公司生产;肉豆蔻酸异丙酯(IPM),上海高维实业有限公司生产;聚氧乙烯醚氢化蓖麻油(RH40),德国 BASF 公司生产;吐温 80(Tween-80),天津市化学试剂六厂生产;司盘 80(Span-80),天津市化学试剂六厂生产;橄榄油,沈阳永洁公司生产;石蜡油,成都市科龙化工试剂厂生产;清宫液,西安某奶牛养殖场提供;宫速清溶液,华秦源动物药业有限公司提供;呋喃西林水溶液,自制。

1.1.3 试验动物 试验用牛共 55 头,从西安某奶牛场选取患化脓性子宫内膜炎(恶露多)和产后急性子宫内膜炎奶牛 28 头;从北京某奶牛场选取患化脓性子宫内膜炎(恶露多)、产后急性子宫内膜炎、粘液性子宫内膜炎和反复子宫内膜炎奶牛共 27 头。

1.2 复方呋喃西林纳米乳的制备

1.2.1 油相的选择 取 IPM、橄榄油、石蜡油分别置于具塞的锥形瓶中,加入过量的呋喃西林,37℃ 水浴条件下超声(30 Hz, 50 W)溶解 24 h 后,用紫外分光光度计测定呋喃西林在油相中的饱和溶解度,确定复方呋喃西林纳米乳的油相。

1.2.2 表面活性剂(S)和助表面活性剂(CoS)的选择 用上述方法测定呋喃西林在 RH 40 和 Tween-80 2 种 S 中的饱和溶解度,筛选复方呋喃西林纳米乳的 S。再分别取上述选定的表面活性剂和 Span 80、乙醇、丙二醇、正丁醇 4 种短链 CoS,按 S 和 CoS 的质量比分别为 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 和 1:9 称取 S 和 CoS,加入 1.2.1 节选定的油相中,涡旋震荡,逐滴加水,观察各组的变化,依据纳米乳的评价标准^[8-9]进行评价,确定制备复方呋喃西林纳米乳的 S 和 CoS。

1.2.3 复方呋喃西林纳米乳的制备 利用转相乳化法制备复方呋喃西林纳米乳^[10]。精确称取油相、表面活性剂和助表面活性剂放入烧杯中,在室温条件下,充分混匀。为最大限度地增加纳米乳体系的载药量,满足临床治疗奶牛子宫内膜炎时的用药要求,根据呋喃西林易溶于二甲基亚砜的性质,选择二甲基亚砜作为增溶剂。将适量呋喃西林溶于二甲基亚砜后,与替硝唑和雌二醇一并加入混合液体中,搅拌直至全部溶解,然后向其中缓慢滴加蒸馏水,边滴加边搅拌,直至形成澄清透明的乳液即可。

1.3 复方呋喃西林纳米乳质量的评价

1.3.1 复方呋喃西林纳米乳类型的鉴别 取相同体积的复方呋喃西林纳米乳 2 份,分别同时加入苏丹红Ⅲ染料和亚甲基蓝染料溶液各 2 滴,静置片刻,观察 2 种染料在纳米乳液中的扩散速度。苏丹红Ⅲ为油性染料,呈红色,易在油中扩散;亚甲基蓝为水溶性染料,呈蓝色,易在水溶液中扩散。若蓝色染料大于红色染料的扩散速度,则此纳米乳为水包油

(O/W)型,相反则为油包水(W/O)型。

1.3.2 形态观察 取复方呋喃西林纳米乳适量,用水稀释 1 倍后,滴加在覆有支持膜的铜网上,静置 10 min 后用滤纸吸干,再滴加 20 g/L 磷钨酸溶液(pH 为 7.4)于铜网上负染 3 min,自然挥干,用透射电子显微镜观察其形态。

1.3.3 粒径检测 取复方呋喃西林纳米乳适量,蒸馏水稀释后,用激光粒度仪测定其平均粒径。

1.3.4 颜色与澄清度考察 根据《中国药典》(2005 年版)Ⅱ部附录 IXA 溶液颜色和 IXB 澄清度检测方法,对复方呋喃西林纳米乳的颜色和澄清度进行考察。

1.3.5 稳定性考察 将纳米乳熔封于棕色安瓿瓶中,分别于 4、40 和 60 ℃条件下贮藏,于第 5、10、20 和 60 天观察是否有分层、絮凝或药物析出现象发生,进行稳定性考察。

1.4 复方呋喃西林纳米乳对奶牛子宫内膜炎的疗效观察

将 2 个奶牛场的子宫内膜炎病牛分别进行分组,西安某奶牛场的患牛随机分为复方呋喃西林纳米乳组(试验组)和清宫液组(对照组),每组 14 头;北京某奶牛场的患牛随机分为复方呋喃西林纳米乳组(试验组)和宫速清组(对照组),其中复方呋喃西林纳米乳组 18 头,宫速清组 9 头。复方呋喃西林纳米乳组患牛阴门及阴门周围消毒后,用 100 mL 生理盐水冲洗子宫,次日经直肠按摩子宫,使子宫收缩,尽可能排出内容物,再吸取 38~45 ℃ 5 g/L 复方呋喃西林纳米乳药液 100 mL,输入子宫并轻轻按摩子宫,以促进药液均匀分布到整个子宫内,每隔 24 h 用药 1 次,连用 3 次。对照组用同法灌注治疗剂量的宫速清溶液或清宫液。每次给药前检查并记录奶牛的恢复状况,疗效分为痊愈、有效和无效 3 种。(1)痊愈:用药后经直肠检查子宫复原,炎症消失,子宫角或子宫体触诊无肿硬感,患牛无痛感反应,子宫收缩后无异常分泌物排出或排出完全正常分泌物,综合检查均为阴性,可配种。(2)有效:用药后子宫炎症明显缓解,触诊痛感及肿胀明显减轻,子宫分泌物基本(接近)正常,但发情周期不正常或乏情而不适于配种,综合判断至少有 1 项未达到阴性。(3)无效:用药后子宫炎症未见减轻,子宫触诊痛感及肿胀仍很明显,子宫分泌物未见好转甚至恶化,综合判定与用药前没有变化。

1.5 数据统计分析

用卡方检验 χ^2 比较复方呋喃西林纳米乳和清

宫液、宫速清对奶牛子宫内膜炎的治愈率、有效率,概率 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 复方呋喃西林纳米乳的油相、表面活性剂和助表面活性剂

结果表明,呋喃西林在石蜡油、IPM 和橄榄油中的溶解度分别为 0.63、0.81 和 1.72 mg/mL,而替硝唑在上述 3 种油中均不溶解,故选择橄榄油为油相。呋喃西林在 RH40 和 Tween-80 中的溶解度分别为 2.01 和 2.05 mg/mL,故选择 Tween-80 为表面活性剂。4 种助表面活性剂均可形成纳米乳,但 Span-80 比其他 3 种更易形成,且较稳定,因此选择 Span-80 为助表面活性剂。复方呋喃西林纳米乳的最佳配方是:呋喃西林 1%,替硝唑 0.3%,Tween-80 32.5%,Span-80 13.7%,橄榄油 5%,蒸馏水 47.5%(各组分含量均为质量分数)。

2.2 复方呋喃西林纳米乳的质量评价

2.2.1 类型 在复方呋喃西林纳米乳中,蓝色染料大于红色染料的扩散速度,故判断此纳米乳为 O/W 型。

2.2.2 形态 在透射电镜下,复方呋喃西林纳米乳的形态见图 1。由图 1 可知,纳米乳呈球形,分布均匀,无粘连。随机选取视野中 500 个液滴进行直径测量,结果表明,乳滴粒径大多分布在 10~100 nm,均一性良好。

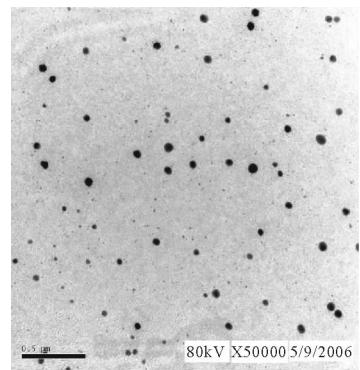


图 1 复方呋喃西林纳米乳的透射电镜照片($\times 50\ 000$)

Fig. 1 Transmission electron micrograph of compound furacilin nanoemulsion ($\times 50\ 000$)

2.2.3 粒径 测定结果表明,复方呋喃西林纳米乳的平均粒径为 67.20 nm。粒度分析结果显示, >60 nm 的粒子占 80%; >70 nm 的粒子占 90%;粒径在 50~70 nm 的占 55%。说明制备的纳米乳粒径较均匀,分布范围窄。

2.2.4 溶液颜色与澄清度 制备的复方呋喃西林纳米乳为黄色澄清透明、均一的液体,溶液颜色同《中国药典》(2005 年版)Ⅱ部的黄绿色调 1 号比色液,经注射用水稀释后出现明显的淡蓝色乳光。表明本试验制备的纳米乳颜色和澄清度符合《中国药典》(2005 年版)标准。

2.2.5 稳定性 复方呋喃西林纳米乳在 4 ,40 和 60 ℃条件下放置 60 d,未出现分层、絮凝或药物析

出现象,表明其在避光条件下稳定性较好。

2.3 复方呋喃西林纳米乳对奶牛子宫内膜炎的治疗效果

由表 1 可知,复方呋喃西林纳米乳试验组奶牛子宫内膜炎的治愈率为 92.9%,比清宫液对照组高 7.2%,但二者差异不显著($P>0.05$);有效率为 92.9%,与清宫液治疗组相同。

表 1 复方呋喃西林纳米乳对西安某奶牛场子宫内膜炎病牛的治疗效果

组别 Group	痊愈头数 No. of cure			有效头数 No. of efficacy			无效头数 No. of inefficacy			治愈率/ % Cure rate	有效率/ % Effective rate
	第 1 次 给药 1st	第 2 次 给药 2nd	第 3 次 给药 3rd	第 1 次 给药 1st	第 2 次 给药 2nd	第 3 次 给药 3rd	第 1 次 给药 1st	第 2 次 给药 2nd	第 3 次 给药 3rd		
试验组 Treatment group	3	6	4	11	4	0	0	1	1	92.9 a	92.9 a
对照组 CK	2	7	3	9	4	1	3	1	1	85.7 a	92.9 a

注:同列数据后标相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)

Note:The same small letters in the same column means quiet difference at $P>0.05$

由表 2 可知,复方呋喃西林纳米乳对奶牛子宫 显著高于宫速清对照组的治愈率(33.3%)和有效率 内膜炎治愈率为 66.7%,有效率为 77.8%,分别极 (44.4%)。

表 2 复方呋喃西林纳米乳对北京某奶牛场子宫内膜炎病牛的治疗效果

组别 Group	痊愈头数 No. of cure			有效头数 No. of efficacy			无效头数 No. of inefficacy			治愈率/ % Cure rate	有效率/ % Effective rate
	第 1 次 给药 1st	第 2 次 给药 2nd	第 3 次 给药 3rd	第 1 次 给药 1st	第 2 次 给药 2nd	第 3 次 给药 3rd	第 1 次 给药 1st	第 2 次 给药 2nd	第 3 次 给药 3rd		
试验组 Treatment group	0	7	5	12	8	2	6	3	4	66.7 a	77.8 a
对照组 CK	0	0	3	5	6	1	4	3	5	33.3 b	44.4 b

注:同列数据后标不同小写字母表示差异极显著($P<0.01$)

Note:The different small letters in the same column means significant difference at $P<0.01$

3 讨论与结论

水、乳化剂和油相是纳米乳形成的必需组分,影响着纳米乳体系的形成、稳定性和载药量。纳米乳制备中最重要的是处方组分及其比例的确定^[11],若处方组分或其比例不当,就不能形成纳米乳或形成的纳米乳区小,达不到增加难溶性药物溶解度、提高药物稳定性和生物利用度的目的^[12]。纳米乳对药物的增溶作用主要是由内核的油相和 S 的烃链 2 部分完成。油相的选择至关重要,这是因为油相的碳链越长,药物的溶解度越高,但碳链过长,纳米乳的稳定性下降^[13],因此纳米乳的油相选择,应结合其稳定性及药物的溶解度来综合考虑。根据纳米乳的形成机理^[14]和呋喃西林的理化性质,以稳定性和乳滴粒径作为纳米乳的主要评价标准,确定 S 和 CoS,

制备出复方呋喃西林纳米乳。试验结果表明,制备的纳米乳可以显著地增溶呋喃西林,与文献[15]报道的结果一致;纳米乳还可增加呋喃西林的稳定性,与文献[16]的报道结果一致。

临床试验结果表明,治疗剂量的复方呋喃西林纳米乳对奶牛子宫内膜炎疗效可靠,治愈后,奶牛在第 1 或第 2 个发情期内均可发情,并接受配种。其疗效提高的原因可能是:① 纳米乳的粒径小,具有更大的比表面积和更强的杀菌能力,与病原菌接触后,能直接进入菌体内发挥药效;② 纳米乳中,亲水性分散相粒径为纳米级,远小于细菌的体积,且连续相是非极性的,微生物难以生长;③ 纳米乳具有很强的渗透性,能迅速渗入组织内杀菌,对各种病原菌引起的深部组织感染均有良好的杀菌作用;④ 纳米乳基质对药物有保护作用,药物在动物体内持续释

放,抗菌效果持久。因此,复方呋喃西林纳米乳的局部药效较强,但其具体的作用机理还有待于进一步研究。复方呋喃西林纳米乳刺激性小,给药间隔时间长,有效地减轻了给药对子宫造成的机械和人为损伤,其治愈率和有效率与清宫液相当,而明显高于宫速清溶液,可以应用于兽医临床。在不同地区,复方呋喃西林纳米乳对奶牛子宫内膜炎表现出不同的治疗结果,且治愈率和有效率差异较大,这可能是由于不同地区致病菌不同所致,具体原因还需进一步研究。

复方呋喃西林纳米乳制备工艺先进,设备简单,成本低廉,克服了呋喃西林水溶性差、易析出、易变性等缺点,其对奶牛子宫内膜炎的治疗效果优于其他常规制剂,弥补了常规制剂的不足。复方呋喃西林纳米乳具有高效安全、无耐药性等优点,有望成为临床应用前景广阔的新一代治疗奶牛子宫内膜炎疾病的纳米级药物。

[参考文献]

- [1] 李世宏,杨国林,杨锐乐,等. 奶牛子宫内膜炎研究进展 [J]. 中国奶牛,2007(1):34-38.
Li S H, Yang G L, Yang R L, et al. Research progress of endometritis in dairy cows [J]. China Dairy Cattle, 2007(1):34-38. (in Chinese)
- [2] 许腊梅,冯万宇,王 岩,等. 奶牛子宫内膜炎研究进展 [J]. 动物医学进展,2008,29(8):71-74.
Xu L M, Feng W Y, Wang Y, et al. Progress on endometritis in dairy cow [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(8): 71-74. (in Chinese)
- [3] 中华兽药大典编辑委员会. 中华兽药大典 [M]. 北京:北京科大电子出版社,中国农业出版社,2005:139.
Editorial committee of Chinese veterinary drugs code. Chinese veterinary drugs code [M]. Beijing: University of Science and Technology Beijing Electron Publishing Company, China Agriculture Press, 2005:139. (in Chinese)
- [4] 柏干荣. 替硝唑的药理与临床应用进展 [J]. 中国药房,1998,9(1):42.
Bo G R. Progress on pharmacologic action and clinic application of tinidazole [J]. China Pharmacy, 1998, 9(1):42. (in Chinese)
- [5] Lee J M, Park K M, Lim S J, et al. Microemulsion formulation of clonixic acid: solubility enhancement and pain reduction [J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54(1):43-49.
- [6] Lawrence M J, Rees G D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, 45(1):89-121.
- [7] von Corswant C, Thoren P, Engstrom S. Triglyceride-based mi-

croemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances [J]. Pharm Sci, 1998, 87(2):200-208.

- [8] 汪 杨,吴 伟,阙 俐. 油-吐温-醇-水体系伪三元相图在自微乳化制剂研究中的应用 [J]. 中国医药工业杂志,2005,36(6):345-348.
Wang Y, Wu W, Que L. Application of pseudo-ternary phase diagrams for oil-tween-alcohol-water system in self-microemulsifying drug delivery system [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2005, 36(6):345-348. (in Chinese)
- [9] 林艳群,甘 勇,甘 莉,等. 地塞米松眼用微乳的研究 [J]. 中国药学杂志,2006,41(5):358-361.
Lin Y Q, Gan Y, Gan L. Preparation of dexamethasone microemulsion for ocular application [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2006, 41(5):358-361. (in Chinese)
- [10] Pons R, Carrera I, Caelles J, et al. Formation and properties of mini-emulsions formed by microemulsions dilution [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2003, 106(12):129-146.
- [11] 于 力,张钧寿,周建平. 纳米乳的研究及其在制剂学领域的应用 [J]. 药学进展,2006,30(11):491-497.
Yu L, Zhang J S, Zhou J P. Research of nano-emulsions and their application in pharmaceutics [J]. Progress in Pharmaceutical Science, 2006, 30(11):491-497. (in Chinese)
- [12] 杨惊宇,严 冬. 新型药物制剂——微乳 [J]. 中国医学工程, 2005, 13(4):378-382.
Yang J Y, Yan D. Drug delivery system——Microemulsion [J]. China Medical Engineering, 2005, 13(4):378-381. (in Chinese)
- [13] 张阳德. 纳米药理学 [M]. 北京:化学工业出版社,2006:163-188.
Zhang Y D. Nano pharmaceutics [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005:163-188. (in Chinese)
- [14] 白永庆,龚福忠,李 丹,等. 微乳液的结构性质及其应用进展 [J]. 化工技术与开发,2007,36(11):24-27.
Bai Y Q, Gong F Z, Li D, et al. Structure and property of microemulsion and its application progress [J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2007, 36(11):24-27. (in Chinese)
- [15] 胡世林. 呋喃西林溶液处方的改进及质量控制 [J]. 安徽医药,2003,7(2):94.
Hu S L. The improvement and quality control on furacilin solution prescription [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2003, 7(2):94. (in Chinese)
- [16] 欧阳五庆,曹发昊,王艳萍. 呋喃西林纳米乳的制备及体外抑菌试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2007(6):81-82.
OuYang W Q, Cao F H, Wang Y P. Preparation and antibacterial test in vitro of furacilin nanoemulsion [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2007(6):81-82. (in Chinese)