

茶树油凝胶的制备及其药效学与刺激性评价

卢秀霞¹, 潘婷婷², 杨杏¹, 叶涛¹, 黄海清¹

1. 广东药科大学医药化工学院, 广东 中山 528458

2. 霸王(广州)有限公司研发中心, 广东 广州 510450

摘要: **目的** 研究茶树油凝胶的处方和制备工艺, 并对其抗炎、抑菌功效与刺激性进行评价。**方法** 以卡波姆-940 为凝胶基质, 聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油 (Cremophor RH-40) 与 1,2-丙二醇为溶剂制备茶树油凝胶, 并考察其外观性状、pH 值、黏度、保湿率、药物含量与稳定性; 分别对茶树油凝胶的抗炎、抑菌效果与刺激性进行评价。**结果** 筛选得茶树油凝胶处方: 茶树油 1.0%、Cremophor RH-40 5.0%、1,2-丙二醇 5.0%、卡波姆-940 0.6%、甘油 8.0%, 加蒸馏水至 100 g, 三乙醇胺溶液调 pH 值至 5.0; 获得澄清透明、均匀细腻、黏稠度适中, 且涂展性良好的茶树油凝胶; pH 值 5.52 ± 0.03 , 黏度 $(48\ 782 \pm 25)$ mPa·s, 放置 24 h 后保湿率 $(93.32 \pm 0.38)\%$, 含茶树油 (9.55 ± 0.10) mg/g; 茶树油凝胶对小鼠耳廓肿胀抑制率为 46.15%, 且与阴性对照组相比差异显著 ($P < 0.01$); 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌与绿脓杆菌的抑菌圈直径分别为 (15.50 ± 0.96) 、 (15.25 ± 2.36) 、 (15.75 ± 1.91) mm; 茶树油凝胶的半数溶血率 (LC_{50}) 为 456 157 mg/L, 血红蛋白变性指数 (DI) 为 157.98%, LC_{50}/DI 值为 2 887.44, 表明无眼刺激性; 一次给药后茶树油凝胶对家兔皮肤的刺激反应平均积分为 0.125, 连续给药 14 d 后动物刺激反应平均积分为 0.036, 表明对家兔皮肤无刺激性反应; 高速离心、强光照与耐寒耐热实验结果表明制剂稳定性良好, 应置于阴凉避光处贮存。**结论** 茶树油凝胶处方设计合理, 制备工艺简单, 符合凝胶局部外用制剂主要指标要求, 具有一定抗炎、抑菌功效, 安全性良好, 为茶树油进一步研究与开发奠定基础。

关键词: 茶树油凝胶; 质量评价; 抗炎功效; 抑菌效果; 溶血实验; 皮肤刺激性; 稳定性

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)21-5082-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.020

Preparation of tea tree oil gel and its pharmacodynamic study and irritation evaluation

LU Xiu-xia¹, PAN Ting-ting², YANG Xing¹, YE Tao¹, HUANG Hai-qing¹

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China

2. Research and Development Center, Guangzhou Bawang Co., Ltd., Guangzhou 510450, China

Abstract: **Objective** To study the prescription and preparation technology of tea tree oil gel, and evaluate its anti-inflammatory efficacy, antibacterial effect and the irritation. **Methods** The tea tree oil gel was prepared using the carbomer-940 as gel matrix, Cremophor RH-40 and 1,2-propylene glycol as solvents. The appearance characters, pH value, viscosity, moisture retention, drug content, and the stability were observed. The anti-inflammatory efficacy, the antibacterial effect and the irritation of tea tree oil gel were evaluated. **Results** The prescription of tea tree oil gel was selected as following tea tree oil (1.0%), Cremophor RH-40 (5.0%), 1,2-propylene glycol (5.0%), Carbomer-940 (0.6%), glycerol (8.0%), with distilled water 100 g, adjusting pH to 5.0 by triethanolamine. The gel exhibited transparent, well uniformity, appropriate viscosity and fine coating expansion performance, with pH value of 5.52 ± 0.03 , viscosity at $(48\ 782 \pm 25)$ mPa·s, the moisture retaining rate of $(93.32 \pm 0.38)\%$ for 24 h test, containing tea tree oil of (9.55 ± 0.10) mg/g. The inhibition rate of tea tree oil gel on the mouse auricle swelling was 46.15%, which was significantly different as compared to the negative control group ($P < 0.01$). The diameters of inhibition zone of the gel against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* respectively was (15.50 ± 0.96) , (15.25 ± 2.36) , and (15.75 ± 1.91) mm. The half hemolysis rate (LC_{50}) and the hemoglobin degeneration index (DI) respectively were 456 157 mg/L and 157.98%. The tea tree oil gel had no eye irritation in rabbits based on the value of LC_{50}/DI 2 887.44. Fourteen consecutive days administration indicated that the tea

收稿日期: 2018-06-08

基金项目: 2017 年度国家级大学生创新创业训练计划立项项目 (201710573013); 广东省化妆品工程技术研究中心开放基金资助项目 (粤科函产学研字 [2015] 1487 号)

作者简介: 卢秀霞 (1982—), 女, 药剂学高级实验师, 硕士研究生, 主要研究药物新剂型与新技术。Tel: 15913364323 E-mail: luxuixian@163.com

tree oil gel had no skin irritation in rabbits. The illumination score of irritative reaction to the rabbit skin was 0.125 after a single administration, while that was 0.036 after successive administration experiment. The results of high speed centrifugalization cold-resistance and heat-resistance tests showed that the preparation exhibited good stability, which needed to be kept tightly in a cool place and protected from light. **Conclusion** The formulation design was reasonable, while the preparation technology was simple, corresponding to the main index of the gel for topical application, with good anti-inflammatory efficacy, antibacterial effect and safety, which offered the basis for further research and development of tea tree oil.

Key words: tea tree oil gel; quality evaluation; anti-inflammatory efficacy; antibacterial effect; hemolysis test; skin irritation; stability

茶树油 (tea tree oil, TTO) 是从桃金娘科白千层属互叶白千层的新鲜枝叶中经水蒸气蒸馏提取的无色至淡黄色澄清挥发性精油, 也称为互叶白千层油, 2002 年被列入《欧洲药典》^[1]。茶树油由 100 多种小分子化学物质组成, 主要由单萜烯、醇类、倍半萜类及其衍生物、鞣质、脂肪酸和脂类化合物等组成, 其中, 松油烯-4-醇是茶树油的主要活性成分, 占茶树油 30%~40%^[2]。茶树油易溶于甲醇、乙醇, 可溶于非极性溶剂, 微溶于水^[3], 其有效活性成分渗透力强, 可以迅速透入毛囊、皮脂腺等表皮组织, 具有天然抗菌、消炎止痛等药理作用, 其抗菌谱广, 抗菌活性强, 对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、痤疮丙酸杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、白色念珠菌等具有较强的天然抗菌活性以及消炎作用^[4-5], 通过激活单核细胞而有效抑制炎性介质产生, 在不影响抗炎因子分泌的同时减少炎症细胞增殖; 通过改变微生物细胞膜的通透性以及破坏微生物细胞膜从而发挥对微生物的抑制作用^[6-7], 能有效治疗由真菌、细菌或病毒感染引起的皮肤疾病, 临床主要用于治疗痤疮、皮癣、脚癣、手足癣、皮炎、炎症丘疹、唇疱疹、口腔黏膜溃疡以及化脓伤口等皮肤感染疾病^[8-10]。茶树油具有性质温和、皮肤渗透性好、高效无刺激等优点, 被广泛用于日化、医药以及香精香料等行业中^[11-12]。目前, 茶树油的市售产品主要有乳剂、霜剂、软膏等皮肤局部外用制剂, 例如粉刺霜、痤疮膏等, 但存在热力学不稳定、久置易氧化变质等问题, 影响药物疗效的发挥。除此之外, 茶树油某些有效成分渗透力强, 因使用浓度过高、用药时间过长或贮藏不当可能引起皮肤干燥、瘙痒和刺痛等刺激性问题^[13], 如桉叶油素、单萜降解产物容易引起皮肤过敏反应。

凝胶剂是将药物加入至适宜的高分子材料凝胶基质中混匀, 形成含有溶解、混悬或乳剂型状态的乳胶稠厚液体或澄清透明、均一稳定的半固体凝胶大分子网状体系^[14-15]。作为一种新型透皮给药载体, 凝胶能增加水难溶性药物的溶解度, 使难溶性有效

成分以分子形式分散于大分子网络体系中, 形成质地均匀细腻、药物附着性好、对皮肤黏膜无刺激的局部外用制剂, 局部给药后释药速度快, 在皮肤上形成具有保护作用的透明保护薄膜, 促进水难溶性药物的释放和透皮吸收, 改善与皮肤黏膜的黏附性, 具有良好生物相容性和稳定性, 能延长药物滞留时间, 且易被机体代谢^[16-17]。凝胶透皮给药可避免肝脏首关效应, 减少胃肠道酶对有效成分的破坏, 从而提高药物生物利用度, 常用于易挥发、易被氧化、水难溶性药物的新型透皮给药载体^[18]。高分子材料凝胶基质能与水溶液混合并能吸收组织渗出液, 有利于分泌物的排泄, 适用于皮肤局部外用治疗, 临床主要用于治疗细菌、真菌、病毒感染等皮肤疾病, 尤其适用于皮肤脂溢性皮炎的治疗^[19]。因此, 本实验选择具有抗菌消炎、祛痘止痒、性质温和的茶树油作为活性物质, 针对其水溶解度低、易挥发、易被氧化的问题, 结合凝胶剂的优点, 将茶树油制成凝胶剂, 并对其外观性状、pH 值、黏度、保湿率、药物含量与稳定性进行评价, 同时考察制剂的抗炎抑菌效果与安全刺激性, 以期获得澄清透明、均匀细腻、黏稠度适中、涂展性良好、透皮吸收效果好, 且使用安全无刺激的茶树油凝胶, 从而增加药物溶解度、提高生物利用度、增强抗炎和抑菌效果, 为进一步研究与开发茶树油透皮给药新剂型提供依据。

1 仪器、试剂、菌种与动物

1.1 仪器

CP225D 型十万分之一电子分析天平, 德国赛多利斯; HH-2 型数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; SZCL-3B 型数显智能控温磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; RCT B S025 型恒温磁力搅拌器, 德国 IKA 公司; 5TGL-16G 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; IS126 型实验室 pH 酸度计, 上海豪迈仪器科技有限公司; NDJ-8S 型旋转式数字粘度计, 上海昌吉地质仪器有限公司; UV-1102 型紫外可见分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司; AM120Z-H 型实验室数显电动搅拌机, 上海昂尼仪

器仪表有限公司; SHZ-82A 型数显恒温测速旋转气浴, 金坛市城东新瑞仪器厂; HPX-9082MBE 型电热恒温培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; JHZ-2 型无菌超净工作台, 广州恒立实验室设备科技有限公司; YXQ-SG46-280S 型手提式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司; WKYIII-100 型微量可调移液器, 邦西仪器科技(上海)有限公司。

1.2 试剂

茶树油, 广西南宁万家辉香料有限公司, 质量分数 91.93% (以挥发性成分总量计算), 其中含松油烯-4-醇 38.02%, 批号 20140418; 茶树油凝胶(自制, 批号 20171015、20171016、20171017); 聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油 (Cremophor RH-40, CRH, 批号 06571724U0)、聚氧乙烯醚 (35) 蓖麻油 (Cremophor EL-35, CEL, 批号 50526668E0)、15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯 (Solutol HS-15, SHS, 批号 54960875L0), 德国 BASF 公司; 阿拉伯胶, 成都市科龙化工试剂厂, 批号 20120428; 卡波姆-940, 廊坊聚通化工有限公司, 批号 14180; 甲基纤维素, 泰安瑞泰纤维素有限公司, 批号 1603-064; 羟丙甲纤维素 (HPMC), 安徽山河药用辅料股份有限公司, 批号 161011; 1,2-丙二醇 (批号 20161129)、黄蓍树胶 (批号 W20110308)、壳聚糖 (批号 20140418), 国药集团化学试剂有限公司; 甘油 (批号 20160805)、三乙醇胺 (批号 20161012)、甲醇 (批号 20161105), 天津市富宇精细化工有限公司; 二甲苯, 上海沃凯生物技术有限公司, 批号 20161213; 灵芝芦荟祛痘膏, 广东二天堂药业有限公司, 批号 16032200; 杰马 BP, 北京桑普生物化学技术有限公司, 批号 20140925; 明胶 (批号 2014128)、海藻酸钠 (批号 20140712)、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 批号 20140627)、十二烷基硫酸钠 (SDS, 批号 20161007)、氯化钠 (批号 20170723)、结晶碳酸钾 (批号 20161226), 天津市福晨化学试剂厂; 营养琼脂, 广东环凯微生物科技有限公司, 批号 1065331; 水为超纯水; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 菌种

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 与绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 均由广东药科大学医药化工学院微生物实验室提供。

1.4 动物

健康家兔 8 只, 雌雄各半 (雌性未孕), 体质量

2~3 kg, 普通级, 购自广州南方医科大学实验动物中心, 实验动物许可证号 SCXK (粤) 2016-0041; 健康的昆明种小鼠 30 只, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 普通级, 购自广州南方医科大学实验动物中心, 实验动物许可证号 SCXK (粤) 2016-0041。

2 方法与结果

2.1 茶树油凝胶的制备

称取卡波姆-940 适量, 滴加甘油适量润湿, 加入蒸馏水, 搅拌均匀, 静置 24 h 使其充分溶胀作为凝胶基质; 称取茶树油 1.0 g, 置于烧杯中, 加入适量溶剂溶解得澄清透明的茶树油溶液, 将该茶树油溶液加至上述已溶胀好的凝胶基质中, 边加边搅拌, 滴加三乙醇胺溶液调节 pH 值至 5.0, 加蒸馏水至 100 g, 4 000 r/min 离心 10 min, 除去气泡, 即得。

2.2 筛选与优化凝胶配方

2.2.1 凝胶基质种类的选择 称取凝胶基质粉末适量, 加蒸馏水至 100 g, 搅拌均匀, 静置 24 h 使其充分溶胀, 滴加 20% 三乙醇胺溶液调节 pH 值。分别以 40% 阿拉伯胶、3.3% 明胶、0.5% 卡波姆-940、6.0% 海藻酸钠、2.0% CMC-Na、2.0% 甲基纤维素、5.0% HPMC、3.0% 黄蓍树胶、5.0% 壳聚糖为凝胶基质, 以凝胶的外观性状 (包括有无光泽、有无沉淀, 有无泡沫等)、成型性、澄明度、油腻感、均匀度、细腻性、黏起感 (手指头将凝胶挑起时的难易程度)、黏稠度、流动性、涂展性 (包括轻质-快速铺展、中质-慢速铺展、厚质-难以铺展) 为评价指标, 以打分形式进行评分筛选, 评分标准为很好: 9~10 分, 较好: 7~8 分, 一般: 5~6 分, 较差: 3~4 分, 很差: 1~2 分。计算并比较综合评分, 选择评分最高的作为凝胶基质, 结果见表 1。结果表明, 0.5% 卡波姆-940 制备的凝胶澄清透明, 成型性较好, 均匀细腻, 黏稠度适中, 无油腻感, 且涂展性良好。因此, 选择卡波姆-940 作为凝胶基质。

2.2.2 卡波姆-940 浓度的确定 称取卡波姆-940 粉末适量, 加蒸馏水至 100 g, 静置 24 h 使其充分溶胀, 滴加 20% 三乙醇胺溶液调节 pH 值。以凝胶基质的外观性状、黏稠度、均匀度、细腻度、涂展性与黏度 (25 ± 1) °C (4 号转子, 转速为 12 r/min) 为评价指标, 考察卡波姆-940 的质量分数分别为 0.3%、0.5%、0.8%、1.0%、1.2%、1.5% 时对凝胶基质进行综合评价。其中, 外观性状包括凝胶的澄清透明度、有无光泽、有无沉淀、有无泡沫等; 黏稠度包括较稀、适中、较黏稠、很黏稠; 涂展性包括

轻质-快速铺展、中质-慢速铺展与厚质-难以铺展。卡波姆-940 质量分数的筛选结果见表 2。当卡波姆-940 质量分数为 0.5%~0.8%时, 均能形成外观澄清

透明、无颗粒沉淀, 色泽光亮, 质地均匀细腻, 黏稠度适中, 且易于涂布, 符合凝胶剂的基本质量要求。因此, 选择卡波姆-940 质量分数为 0.5%~0.8%。

表 1 茶树油凝胶基质种类的筛选结果

Table 1 Screening results of tea tree oil gel matrix

基质种类	用量/%	外观性状	成型性	澄明度	油腻感	均匀度	细腻性	黏起感	黏稠度	流动性	涂展性	综合评分
阿拉伯胶	40.0	5	2	3	7	8	8	4	7	6	7	57
明胶	3.3	7	4	3	6	8	8	5	7	6	6	60
卡波姆-940	0.5	9	8	8	9	9	9	9	9	8	9	87
海藻酸钠	6.0	6	7	3	6	8	8	8	8	8	8	70
CMC-Na	2.0	9	8	8	8	9	9	7	8	9	9	84
甲基纤维素	2.0	9	7	8	9	9	8	7	8	9	9	83
HPMC	5.0	9	6	8	8	9	9	8	7	6	8	78
黄蓍树胶	3.0	4	5	3	8	7	7	7	6	6	8	61
壳聚糖	5.0	4	6	3	8	5	6	6	6	6	8	58

表 2 卡波姆-940 质量分数的筛选结果

Table 2 Concentration screening results of carbopol-940

卡波姆-940/%	外观性状	黏稠度	均匀度	细腻度	涂展性	黏度/(mPa·s)
0.3	澄清透明、色泽光亮、无颗粒沉淀	较稀	均匀	细腻	轻质、快速铺展	48 820
0.5	澄清透明、色泽光亮、无颗粒沉淀	适中	均匀	细腻	轻质、快速铺展	48 842
0.8	澄清透明、色泽光亮、无颗粒沉淀	适中	均匀	细腻	轻质、快速铺展	48 865
1.0	澄清透明、色泽光亮、稍有沉淀	较黏稠	较均匀	稍有结团	中质、慢速铺展	48 890
1.2	半透明、无光泽、有颗粒沉淀	很黏稠	不均匀	结团	厚质、难以铺展	48 935
1.5	半透明、无光泽、有颗粒沉淀	很黏稠	不均匀	结团	厚质、难以铺展	48 930

2.2.3 溶剂种类的确定 称取卡波姆-940 粉末 0.6 g, 加入甘油 8.0 g 润湿, 加蒸馏水至 100 g, 静置 24 h 使其充分溶胀作为凝胶基质; 称取茶树油 1.0 g, 按表 3 分别加入溶剂适量, 混匀, 于 30 ℃ 恒温水浴加热溶解 10 min 得茶树油溶液, 将该茶树油溶液加至上述溶胀好的卡波姆-940 凝胶基质中, 搅拌均匀, 滴加 20% 三乙醇胺溶液调节 pH 值, 制得茶树油凝胶。分别以凝胶的外观性状、保湿率、茶树油浓度为评价指标, 考察 CRH、SHS、CEL、1,2-丙二醇、甘油为溶剂时对茶树油凝胶的影响, 溶剂种类的筛选结果见表 3。可知, 溶剂种类对茶树油凝胶的保湿率、药物浓度影响不大, 但影响制剂外观性状。当 CRH 与 1,2-丙二醇、CRH 与 SHS、SHS 与 CEL 为复合溶剂时, 所得凝胶均澄清透明、均匀细腻。与非离子表面活性剂 SHS、CEL 相比, 1,2-丙二醇较为安全, 毒性、刺激性较小, 且水溶性较好, 是常用的透皮促进剂, 具有一定保湿效果^[20-21]。因此, 选择 CRH (5.0%) 与 1,2-丙二醇 (5.0%) 作

为复合溶剂。

2.3 茶树油凝胶的配方与工艺

茶树油凝胶制备方法如下: 称取茶树油 1.0 g, 加入 5.0 g CRH、5.0 g 1,2-丙二醇, 于 30 ℃ 恒温水浴加热溶解 10 min, 混合均匀, 得茶树油溶液; 称取卡波姆-940 粉末 0.6 g, 加入甘油 8.0 g 润湿, 加蒸馏水适量, 静置 24 h 使其充分溶胀作为凝胶基质; 将该茶树油溶液缓慢加至上述已溶胀好的卡波姆-940 凝胶基质中, 充分搅拌均匀, 滴加 20% 三乙醇胺溶液调 pH 值至 5.0, 加蒸馏水至 100 g, 4 000 r/min 离心 10 min, 除去气泡, 获得澄清透明、均匀细腻、黏稠度适中, 且涂展性良好的茶树油凝胶。

2.4 茶树油凝胶的质量评价

2.4.1 外观性状 茶树油凝胶为澄清透明、均匀细腻、黏稠度适中、无油腻黏滞感、肤感舒适, 且涂展性良好、易渗透吸收、涂抹后肤感舒适、无刺激性的半固体凝胶。

2.4.2 pH 值测定 取 3 个批号茶树油凝胶(批号分

表 3 溶剂种类的筛选结果

Table 3 Screening results of solvent type

CRH/g	SHS/g	CEL/g	1,2-丙二醇/g	甘油/g	外观性状	保湿率/%	茶树油质量分数/(mg·g ⁻¹)
5.0	—	—	5.0	—	澄清透明、均匀细腻	93.18	9.58
5.0	—	—	—	5.0	浅白、不透明	92.78	9.41
5.0	5.0	—	—	—	澄清透明、均匀细腻	93.27	9.46
—	5.0	—	5.0	—	微白、稍透明	91.43	9.62
—	5.0	—	—	5.0	微白、稍透明	92.91	9.35
—	5.0	5.0	—	—	澄清透明、均匀细腻	91.59	9.72
—	—	5.0	5.0	—	浅白、不透明	93.04	9.62
—	—	5.0	—	5.0	浅白、不透明	92.77	9.71

别为 20171015、20171016、20171017) 适量, 分别测定 pH 值, 结果茶树油凝胶 pH 值分别为 5.50、5.52、5.55, RSD 为 0.46%, 符合皮肤局部外用制剂对 pH 值的要求。

2.4.3 黏度的测定 取 3 个批号茶树油凝胶 (批号分别为 20171015、20171016、20171017) 适量, 采用 NDJ-8S 旋转式数字黏度计测定室温下 (25±1)℃ 凝胶剂的黏度 (4 号转子, 转速为 12 r/min), 结果 3 批茶树油凝胶的黏度分别为 48 756、48 785、48 806 mPa·s, RSD 为 0.05%。

2.4.4 保湿率的测定 取 3 个批号茶树油凝胶 (批号分别为 20171015、20171016、20171017) 适量, 精密称定干燥至恒定质量的样品质量 (m_0), 将茶树油凝胶均匀涂布于载玻片上, 将该载玻片放置于室温 (25±1)℃、相对湿度为 (43.16±0.39)% 的恒温、恒湿密闭干燥器中, 放置 24 h 后取出样品, 精密称量放置 24 h 后的样品质量 (m_1), 根据公式计算样品保湿率 (保湿率= m_1/m_0), 结果 3 批茶树油凝胶经放置 24 h 后的保湿率分别为 92.99%、93.24%、93.73%, RSD 为 0.40%, 表明茶树油凝胶保湿性良好, 有利于在皮肤上涂展。

2.4.5 药物含量的测定 分别精密称取茶树油 0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 制得 60、80、100、120、150 μg/mL 系列质量浓度的茶树油甲醇溶液, 以甲醇为空白参照, 于波长 264.5 nm 测定吸光度 (A)。分别以 A 值为纵坐标, 茶树油甲醇溶液质量浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得茶树油标准曲线方程: $A=0.005 C-0.000 5$, $r=0.999 6$ 。

分别取 3 个批号茶树油凝胶 (批号分别为 20171015、20171016、20171017), 分别精密称取 0.10 g, 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 制得茶

树油供试液。以甲醇为空白, 于波长 264.5 nm 测定茶树油供试液的 A , 代入标准曲线计算茶树油的质量分数。结果 3 个批号茶树油凝胶中茶树油的质量分数分别为 9.44、9.62、9.59 mg/g, RSD 为 1.0%。

2.5 茶树油凝胶的抗炎功效评价

2.5.1 二甲苯所致小鼠耳廓肿胀实验 选择健康昆明种小鼠 75 只, 雌雄各半, 随机分为 3 组, 每组 25 只。对照组为每只小鼠给予生理盐水 0.2 mL; 阳性对照组给予灵芝芦荟祛痘膏, 给药剂量为每只小鼠 0.2 g; 供试组给予茶树油凝胶剂, 给药剂量为每只小鼠 0.2 g。实验第 1 天, 分别给每只小鼠右耳廓内侧与外侧均匀涂抹相应药物, 连续给药 7 d, 每天给药 1 次, 并于第 6 天晚上给药后对小鼠禁食过夜。于第 7 天末次给药 30 min 后轻轻擦拭干净小鼠右耳, 并于右耳廓内侧与外侧均匀涂抹二甲苯 50 μL, 左耳作为自身对照。致炎 40 min 后颈椎脱臼处死小鼠, 沿小鼠耳廓线剪下耳朵, 分别于左耳和右耳做记号, 用 6 mm 打孔器于双耳对称部位取下耳片, 称定质量, 记录数据, 左右耳片质量差值为炎症肿胀度, 按公式计算小鼠耳廓肿胀抑制率 [耳廓肿胀抑制率=(对照组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/对照组平均肿胀度]。

2.5.2 统计学处理及结果 采用统计学软件 PASW Statistics 18.0 处理二甲苯所致小鼠耳廓肿胀抑制率, 组间作 t 检验, 结果见表 4。可知, 阳性对照组与茶树油凝胶组对小鼠耳廓肿胀抑制率分别为 42.31%与 46.15%, 且与对照组相比差异显著 ($P<0.01$)。结果表明, 茶树油凝胶对二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀有明显抑制作用, 具有一定的抗炎功效。

2.6 茶树油凝胶的抑菌效果评价

2.6.1 培养基的制备 称取营养琼脂 33 g, 溶解于 1 000 mL 超纯水中, 搅拌均匀, 加热煮沸直至琼脂

表 4 茶树油凝胶对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 25$)Table 4 Influence of tea tree oil gel on mouse auricle swelling induced by xylene ($\bar{x} \pm s, n = 25$)

组别	左耳耳片平均质量/mg	右耳耳片平均质量/mg	耳廓平均肿胀度/mg	耳廓肿胀抑制率/%
对照	6.6±0.9	9.2±1.3	2.6±0.7	—
灵芝芦荟祛痘膏	6.4±0.5	7.9±1.0	1.5±0.9**	42.31
茶树油凝胶	6.6±1.1	8.0±1.2	1.4±0.3**	46.15

与对照组比较: ** $P < 0.01$, 表 5 同** $P < 0.01$ vs control group, same as table 5

完全溶解, 于 121 °C 高温高压灭菌 30 min, 待温度降至 70 °C 时, 分装至已灭菌的培养皿中, 备用。

2.6.2 菌种活化 分别吸取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌与绿脓杆菌的菌种 300 μ L, 加入玻璃试管中, 倒入试管的 1/4~1/3 营养肉汤液体培养基, 37 °C 活化培养 8 h, 当培养液由完全澄清变为浑浊时, 表明菌种已活化。

2.6.3 菌液的稀释 取已活化好的菌液适量, 用无菌生理盐水将活化菌液分别稀释至 10、100、1 000、10 000、100 000 倍, 加到培养皿中, 倒入营养肉汤琼脂培养基, 待凝固后, 倒扣平板, 37 °C 培养 24 h。采用细菌平板计数法, 将各种菌悬液的浓度稀释至 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mL, 备用。

2.6.4 抑菌圈实验 采用孔洞法, 以 0.3% 杰马 BP 溶液作为阳性对照组, 空白凝胶基质作为对照组, 茶树油凝胶作为供试组。精密吸取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌与绿脓杆菌供试菌悬液 300 μ L, 加到无菌培养皿中, 迅速倒入营养肉汤琼脂培养基 15~20 mL, 轻轻晃动培养皿使菌液均匀分布, 待培养基冷却凝固后, 在培养皿上等距离打孔, 并做好标记。分别加入 50 μ L 的对照、阳性对照与茶树油凝胶供试组样品, 轻轻晃动混匀, 待干后, 倒扣平板, 置于 37 °C 有氧恒温培养箱中培养, 24 h 后观察结果, 测量抑菌圈直径大小, 重复 4 次, 取平均值, 抑菌圈实验结果见表 5。抑菌圈实验判定标准: 抑菌圈直径大于 20 mm, 极敏; 15~20 mm, 高敏; 10~15 mm, 中敏; 7~9 mm, 低敏; 小于 7 mm, 不敏感。

2.6.5 统计学处理及结果 采用统计学软件 PASW

Statistics 18.0 处理抑菌圈实验结果, 组间作 t 检验, 结果如表 5 所示。阳性对照组对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌与绿脓杆菌的抑菌圈直径分别为 (19.75±0.96)、(20.00±1.41)、(19.50±1.00) mm, 茶树油凝胶组对 3 种菌的抑菌圈直径分别为 (15.50±0.96)、(15.25±2.36)、(15.75±1.91) mm, 且与对照组相比, 具有统计学意义 ($P < 0.01$)。按照抑菌圈试验判定标准, 茶树油凝胶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌与绿脓杆菌均具有明显的抑制作用, 表明具有良好的抑菌功效。

2.7 茶树油凝胶的溶血实验

2.7.1 红细胞混悬液的制备 取 10~20 mL 新鲜家兔血液, 玻璃棒快速搅拌血液 15 min, 除去纤维蛋白原, 使形成脱纤红细胞血液, 加入生理盐水稀释, 置于离心管中, 于室温下 3 000 r/min 离心 15 min, 除去上清液, 继续用生理盐水洗涤 2~3 次, 3 000 r/min 离心 15 min, 直至上清液呈澄清无色, 洗涤干净。精密吸取 2.0 mL 红细胞, 用生理盐水稀释并定容至 100 mL, 配成 2% 的红细胞混悬液, 置于冰箱 4 °C 保存, 备用。

2.7.2 溶血率的测定 取 8 个干净的玻璃试管, 编号, 1~5 号管为茶树油凝胶受试组, 6 号管以生理盐水作为阴性对照, 7 号管以蒸馏水作为完全溶血对照, 8 号管以 100 mg/L 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液作为阳性对照。分别吸取红细胞混悬液 1.0 mL 于 1~8 号玻璃试管中, 按照表 6, 于 1~5 号管中依次加入不同体积的茶树油凝胶, 生理盐水定容至 4.0 mL, 混匀, 得系列浓度的茶树油凝胶受试样品;

表 5 茶树油凝胶对 3 种菌的抑菌圈测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Table 5 Inhibition zone results of tea tree oil gel against three species of bacteria ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	抑菌圈直径大小/mm		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	绿脓杆菌
对照	6.50±0.08 (不敏感)	6.45±0.09 (不敏感)	6.55±0.08 (不敏感)
阳性对照	19.75±0.96** (高敏)	20.00±1.41** (高敏)	19.50±1.00** (高敏)
茶树油凝胶	15.50±0.96** (高敏)	15.25±2.36** (高敏)	15.75±1.91** (高敏)

表 6 茶树油凝胶溶血实验安排

Table 6 Sample addition of tea tree oil gel in hemolysis test

试管 序号	红细胞混 悬液/mL	茶树油凝 胶/mL	生理盐 水/mL	蒸馏 水/mL	SDS 溶 液/mL
1	1.0	0.9	2.1	—	—
2	1.0	1.5	1.5	—	—
3	1.0	2.4	0.6	—	—
4	1.0	2.7	0.3	—	—
5	1.0	3.0	—	—	—
6	1.0	—	3.0	—	—
7	1.0	—	—	3.0	—
8	1.0	—	—	—	3.0

于 6~8 号管中分别加入 3.0 mL 生理盐水、蒸馏水与 SDS 溶液, 轻轻混匀。将 1~8 号管置于 (37±0.5) °C 恒温水浴中孵育 30 min, 取出终止反应, 经 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 以生理盐水为空白对照, 分别于 540、560、575 nm 波长处测定紫外 A 值, 每个受试物设 3 个平行样, 取平均值。当 560 nm 时, 根据公式计算茶树油凝胶的溶血率 [HR, $HR = (A_{560} - A_{560}^{\text{阴性对照组}}) / (A_{560}^{\text{全溶血对照组}} - A_{560}^{\text{阴性对照组}})$], 以茶树油凝胶受试样品的质量浓度 (C) 为横坐标, HR 为纵坐标做直线回归, 得回归方程 $HR = 7 \times 10^{-5} C + 18.069$, $r = 0.999 2$, 当 $HR = 50\%$ 时, 代入溶血率回归方程, 计算得茶树油凝胶的半数溶血率 (LC_{50}) 为 456 157 mg/L。

2.7.3 血红蛋白变性指数的测定 以茶树油凝胶受试样品的质量浓度 (C) 为横坐标, A 值为纵坐标, 作直线回归方程。当波长 540 nm 时, 得 $A_{540} = 2 \times 10^{-7} C + 0.246$, $r = 0.999 5$; 当波长 575 nm 时, 得 $A_{575} = 8 \times 10^{-8} C + 0.255$, $r = 0.999 2$ 。分别将茶树油凝胶受试样品的 LC_{50} , 即 456 157 mg/L, 代入上述直线回归方程, 计算得 A_{540} 、 A_{575} 分别为 0.337、0.291。分别计算完全溶血对照组蒸馏水、茶树油凝胶受试样品以及阳性对照组 SDS 溶液离心上清液的 A_{575}/A_{540} 值, 根据公式计算茶树油凝胶的血红蛋白变性指数 [DI, $DI = (R_1 - R_2) / (R_1 - R_3)$], 式中 R_1 为完全溶血对照组蒸馏水离心上清液的 A_{575}/A_{540} 值, R_2 为茶树油凝胶受试样品离心上清液的 A_{575}/A_{540} 值, R_3 为阳性对照组 SDS 溶液离心上清液的 A_{575}/A_{540} 值] 为 157.98%。根据茶树油凝胶的 LC_{50}

与 DI, 计算 LC_{50}/DI (L/D) 为 2 887.44, 按照表 7 家兔红细胞溶血实验眼刺激性分级标准, 由于 $L/D > 100$, 表明茶树油凝胶无眼刺激性。

表 7 家兔红细胞溶血实验眼刺激性分级标准

Table 7 Grading standard of ocular irritation of rabbit blood cells in hemolysis test

L/D	分级标准
$L/D > 100$	无刺激性
$10 < L/D \leq 100$	微刺激性
$1 < L/D \leq 10$	轻度刺激性
$0.1 < L/D \leq 1$	中度刺激性
$L/D \leq 0.1$	重度刺激性

2.8 茶树油凝胶的家兔皮肤刺激性实验

2.8.1 急性皮肤刺激性实验 选择健康家兔 8 只, 雌雄各半, 于实验前 24 h 将家兔背部脊柱两侧皮肤脱毛, 脱毛范围左、右各约 3 cm×3 cm, 温水清洗, 擦干皮肤, 观察脱毛区域有无红斑、水肿以及破损。家兔背部脊柱左侧实验区皮肤均匀涂抹茶树油凝胶, 给药剂量 0.5 g/kg, 用二层消毒纱布覆盖并以无刺激性胶布加以固定, 另一侧皮肤作为自身对照。采用封闭试验, 一次敷药时间为 4 h。给药 4 h 后, 用温水清除残留受试物, 于清除残留受试物后 1、24、48、72 h 观察并记录皮肤给药部位有无红斑、水肿等皮肤刺激反应, 按表 8 进行皮肤刺激反应评分, 计算家兔于每个观察时间点的刺激反应总积分, 按公式计算家兔皮肤刺激反应的平均积分 (刺激反应平均积分 = Σ 红斑和水肿积分 / 受试动物数), 根据 24、48、72 h 的最高积分平均值, 按表 9 判定茶树油凝胶对家兔急性皮肤的刺激强度, 结果见表 10。由表 10 可知, 茶树油凝胶及其空白自身对照对家兔皮肤的刺激反应平均积分的最高值分别为 0.125、0.250, 皮肤刺激积分均 < 0.5 , 均未见明显红斑和焦痂形成, 无水肿、充血、渗液、溃烂以及色素沉着等皮肤刺激反应, 表明茶树油凝胶对家兔无急性皮肤刺激性。

2.8.2 多次皮肤刺激性实验 选择健康家兔 8 只, 雌雄各半, 实验前 24 h 将家兔背部脊柱两侧皮肤脱毛, 脱毛范围左、右各约 3 cm×3 cm, 温水清洗, 擦干皮肤, 观察脱毛区域有无红斑、水肿以及破损。家兔背部脊柱左侧试验区皮肤均匀涂抹茶树油凝胶, 给药剂量为 0.5 g/kg, 给药后用二层消毒纱布

表 8 皮肤刺激反应评分标准

Table 8 Grading standard of skin irritation reaction

皮肤反应	积分	皮肤反应	积分
水肿形成		红斑和焦痂形成	
无水肿	0	无红斑	0
轻微水肿（勉强可见）	1	轻微红斑（勉强可见）	1
轻度水肿（皮肤隆起轮廓清楚）	2	明显红斑	2
中度水肿（皮肤隆起约 1 mm）	3	中度-重度红斑	3
重度水肿（皮肤隆起超过 1 mm，范围扩大）	4	严重红斑（紫红色）至轻微焦痂形成	4
最高积分	8		

表 9 皮肤刺激强度分级

Table 9 Intensity classification of skin irritation

积分均值	强度
[0.0, 0.5)	无刺激性
[0.5, 2.0)	轻刺激性
[2.0, 6.0)	中刺激性
[6.0~8.0]	强刺激性

覆盖并以无刺激性胶布加以固定,另一侧皮肤作为自身对照。采用封闭试验,每天给药1次,连续给药14 d,从给药第2天开始,用温水清除残留受试物,1 h后观察并记录结果,按表8进行皮肤刺激反应评分,计算家兔于每个时间点的刺激反应总积分,按公式计算每天每只动物刺激反应的平均积分[每天每只动物平均积分=Σ红斑和水肿积分/(14×受

表 10 茶树油凝胶对家兔急性皮肤刺激性实验评分结果 ($n=8$)

Table 10 Grading results of tea tree oil gel for acute skin irritation in rabbits ($n = 8$)

组别	例数	刺激反应总积分				刺激反应平均积分				刺激强度分级
		1 h	24 h	48 h	72 h	1 h	24 h	48 h	72 h	
茶树油凝胶	8	0	1	1	0	0.000	0.125	0.125	0.000	无刺激性
空白对照	8	0	2	0	0	0.000	0.250	0.000	0.000	无刺激性

试动物数)], 根据表 9 判定家兔皮肤刺激强度, 评价茶树油凝胶对家兔多次皮肤的刺激强度, 结果见表 11。可知, 茶树油凝胶及其空白自身对照对家兔皮肤的每天每只动物刺激反应平均积分分别为 0.036、0.027, 皮肤刺激积分均 <0.5 , 家兔背部受试区皮肤均未见明显红斑和焦痂形成, 无水肿、充血、渗液、溃烂以及色素沉着等皮肤刺激反应, 表明茶树油凝胶对家兔无多次皮肤刺激性。

2.9 茶树油凝胶的稳定性考察

2.9.1 高速离心实验 取3批茶树油凝胶(批号分别为20171015、20171016、20171017)适量,分别置于离心管中,10 000 r/min 离心 30 min,观察茶树

油凝胶外观性状、有无油水分离和涂展性变化。结果 3 批茶树油凝胶经高速离心后,外观仍澄清透明,均匀细腻,涂展性良好,未见分层、泛粗、浮油、变稀、沉淀以及油水分离等不稳定现象,表明茶树油凝胶经高速离心后稳定。

2.9.2 强光照试验 取3批茶树油凝胶(批号分别为20171015、20171016、20171017)适量,放置于密封容器中,于(4 500±500) lx强光照条件下持续照射24 h。取出后观察外观性状、pH值、黏度、涂展性、保湿率与药物含量的变化情况。结果茶树油凝胶与试验前无明显差异,外观仍澄清透明,均匀细腻,涂展性良好,无分层、泛粗、浮油、变稀

表 11 茶树油凝胶对家兔多次皮肤刺激性实验评分结果 ($n=8$)

Table 11 Grading results of tea tree oil gel for multiple skin irritation in rabbits ($n = 8$)

[illegible]

以及油水分离现象;3 个批号茶树油凝胶 pH 值分别为 5.45、5.35、5.47;黏度分别为 48 806、48 779、48 815 mPa·s;保湿率分别为 92.73%、93.53%、92.15%;分别含茶树油 8.47、8.15、7.92 mg/g, RSD 为 3.4%, 药物含量有所降低, 表明茶树油凝胶应避光贮存。

2.9.3 耐寒试验 取 3 批茶树油凝胶(批号分别为 20171015、20171016、20171017)适量, 于 -5 ℃ 冰箱中放置 24 h, 取出后恢复至室温, 观察外观性状、pH 值、黏度、涂展性、保湿率与药物含量的变化情况。结果茶树油凝胶恢复至室温后与试验前无明显差异, 外观仍澄清透明, 均匀细腻, 涂展性良好, 无分层、泛粗、浮油、变稀以及油水分离现象;3 个批号茶树油凝胶 pH 值分别为 5.34、5.41、5.48;黏度分别为 48 823、48 766、48 757 mPa·s;保湿率分别为 93.24%、92.99%、91.30%;分别含茶树油 9.13、9.32、9.25 mg/g, RSD 为 1.0%, 表明茶树油凝胶耐寒性能较好, 符合稳定性要求。

2.9.4 耐热试验 取 3 批茶树油凝胶(批号分别为 20171015、20171016、20171017)适量, 于 40 ℃ 烘箱中放置 24 h, 取出后恢复至室温, 观察外观性状、pH 值、黏度、涂展性、保湿率与药物含量的变化情况。结果茶树油凝胶恢复至室温后, 除了药物含量有所下降以外, 其他指标与试验前无明显差异, 外观仍澄清透明, 均匀细腻, 较易涂展, 无分层、浮油、变稀以及油水分离现象;3 个批号茶树油凝胶 pH 值分别为 5.50、5.46、5.43;黏度分别为 48 749、48 796、48 828 mPa·s;保湿率分别为 92.69%、92.27%、90.74%;茶树油含量分别为 8.22、8.06、7.85 mg/g, RSD 为 2.3%, 表明茶树油凝胶应置于阴凉处贮存。

3 讨论

3.1 茶树油凝胶的配方筛选

3.1.1 凝胶基质的选择 在凝胶基质选择中, 由表 1 可知, 阿拉伯胶、明胶成型性均较差, 澄明度也不符合实验要求;黄耆树胶和壳聚糖基本不能很好地成型, 整体外观较为浑浊, 放置一段时间后出现分层。卡波姆-940 和纤维素类均有很好的外观性状和澄明度, 成型性好, 均匀细腻, 黏稠度适中, 涂展性良好, 其中卡波姆-940 综合评分最高。卡波姆-940 为白色疏松粉末, 具有较强的吸湿性和酸性, 可溶于水、甘油、乙醇, 具有胶体溶液的特性, 由于其分子结构中含有 52%~68% 的酸性基团, 可用

碱性物质中和, 当用碱中和时, 黏稠度逐渐增大, 当凝胶 pH 值在 6~12 时有最大黏稠度, 从而形成澄清透明的凝胶^[22-23]。卡波姆-940 凝胶无毒、无刺激性, 质地均匀, 具有水溶性基质的特点, 在皮肤表面附着性强, 无油腻, 可水洗, 与皮肤耦合效果好, 具有良好的安全性与稳定性, 同时具有良好的黏合性、增稠性、乳化性、助悬性和成膜性, 可作为生物黏附剂, 延长药物在皮肤表面的滞留时间, 提高药物吸收, 可用于控制药物的释放, 已被广泛用于制剂领域, 是凝胶制备中最常用的基质^[24-25]。因此, 本实验选择卡波姆-940 作为凝胶基质。

3.1.2 凝胶基质用量的确定 1.0%卡波姆-940 水分散体可用碱性物质中和, 形成凝胶, 根据所需凝胶的黏稠度不同, 常用水分散体的质量分数为 0.1%~3.0%^[26-27]。由表 2 可知, 当卡波姆-940 质量分数在 1.0%以上时, 基质比较黏稠, 成型性较差, 均出现颗粒沉淀, 有结团现象, 不利于在皮肤上涂展;当卡波姆-940 质量分数为 0.3%时, 黏稠度较小, 不利于附着在皮肤上;当质量分数在 0.5%~0.8%时, 成型性较好, 外观澄清透明, 无颗粒沉淀, 色泽光亮, 质地均匀细腻, 黏稠度适中, 且易于涂布, 符合凝胶剂的基本质量要求。

3.1.3 溶剂种类对茶树油增溶效果的影响 茶树油脂溶性较强, 在水中几乎不溶, 处方中需要加入一定量的表面活性剂, 从而增加药物的溶解度, 同时能发挥其抑菌功效和促渗透作用。使用表面活性剂增溶, 可以减少或消除制剂中的有机溶剂, 避免添加有机溶剂引起的稳定性与安全性问题^[28]。CRH 是一种乳化剂、增溶剂, 在水和醇水溶液中很稳定, 能使天然和化学合成的脂溶性成分在水中溶解形成稳定溶液, 以提高药物生物利用度, 且不改变药物的理化性质^[29]。本实验采用 CRH 作为增溶剂, 配制茶树油溶液, 添加量少, 形成茶树油增溶液后能以任意比例稀释, 理化性质稳定, 如果温度过低, 需要先加热融解 CRH, 再加入茶树油与 1,2-丙二醇, 混合均匀, 制得澄清透明的茶树油增溶液。

本实验分别考察 CEL、CRH、SHS、1,2-丙二醇、甘油为溶剂时对茶树油增溶效果的影响。当使用 CRH 与 1,2-丙二醇、CRH 与 SHS、SHS 与 CEL 作为复合溶剂时, 茶树油增溶效果好, 所形成的凝胶外观澄清透明、均匀细腻, 且茶树油含量较高, 符合制剂要求。但 CRH 与 SHS、SHS 与 CEL 作为复合溶剂时, 所得茶树油凝胶较为油腻, 影响肤感;

同时, 与非离子表面活性剂 SHS、CEL 相比, 1,2-丙二醇较为安全, 是一种良好的透皮促进剂^[20-21], 能使形成的凝胶更均匀。因此, 选择 CRH 与 1,2-丙二醇作为复合溶剂。

3.2 茶树油凝胶的抗炎功效

二甲苯所致小鼠耳廓肿胀实验是以局部充血、渗出、水肿为特征的急性炎症动物模型, 为目前评价药物抗炎功效最常用的方法^[30]。本实验采用二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀抑制率实验, 研究茶树油凝胶对炎症的抑制作用, 并与市售灵芝芦荟祛痘膏相比较, 结果表明, 灵芝芦荟祛痘膏阳性对照组与茶树油凝胶供试组对小鼠耳廓肿胀抑制率分别为 42.31%与 46.15%, 且与阴性对照组相比, 具有统计学意义 ($P < 0.01$), 即茶树油凝胶对二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀有明显抑制作用, 具有一定的抗炎功效, 为临床应用提供依据。

3.3 茶树油凝胶的抑菌效果

细菌在一定 pH 值和温度条件下, 可以在营养琼脂平板上生长, 18~20 h 即能在平板上长出肉眼可见的菌落。抑菌圈法, 即水平扩散法, 其基本原理是在已接种供试菌的琼脂培养基上加入适量抑菌剂或杀菌剂, 使之接触培养基和细菌, 经恒温培养一定时间后, 因药剂的渗透扩散作用, 在施药部位范围内因杀死病菌而抑制细菌在培养基上的生长, 从而形成透明抑菌圈, 根据抑菌圈的有无和大小, 可判断所加入的试剂是否具有抑菌性能以及抑菌性能的大小, 其中孔洞法操作简单、方便快捷, 获得的抑菌圈质量高、重复性好, 是优先选用的方法^[31]。本实验以 0.3% 杰马 BP 溶液作为阳性对照, 空白凝胶基质作为阴性对照, 茶树油凝胶作为供试组, 考察茶树油凝胶的抑菌效果。结果表明, 茶树油凝胶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌与绿脓杆菌的抑菌圈直径分别为 (15.50 ± 0.96) 、 (15.25 ± 2.36) 、 (15.75 ± 1.91) mm, 与阴性对照组相比, 具有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明茶树油凝胶具有良好抑菌功效。

3.4 茶树油凝胶的溶血实验

常用的刺激性评价方法主要有眼刺激性实验、急性皮肤刺激性实验、多次皮肤刺激性实验等, 然而目前已建立相关的实验动物体外替代方法, 将逐步舍弃使用动物实验进行安全性评价^[32]。目前我国已建立了红细胞溶血实验方法, 通过受试样品对血液的主要破坏作用从而使红细胞溶血并裂解死亡, 以溶血作用的强弱来评价其破坏性, 研究表明^[33],

红细胞溶血实验结果与兔眼刺激性实验结果具有良好的相关性, 因此, 本研究采用红细胞溶血实验替代兔眼刺激性实验。

当茶树油凝胶受试样品+生理盐水与红细胞混悬液的体积比为 1:1 时, 恒温水浴中孵育 30 min, 所得受试样品黏度过大, 导致反应不完全, 取出终止反应后离心不彻底, 所得上清液浑浊, 影响 A 值的测定, 难以测得溶血率; 当(茶树油凝胶受试样品+生理盐水)与红细胞混悬液的体积比增大至 3:1 时, 生理盐水定容至 4.0 mL, 从而降低茶树油凝胶受试样品的黏度, 能与红细胞混悬液反应, 经 3 000 r/min 离心 15 min, 可得上清液, 分别于 540、560、575 nm 波长测得 A 值, 根据预试验结果调整茶树油凝胶受试样品的浓度, 设置 5~6 个加入量, 使其与红细胞混悬液反应后的溶血率在 50% 上下均有分布, 以保证能得到较为准确的 LC_{50} 。根据茶树油凝胶 LC_{50} 与 DI 计算 $L/D = 2\ 887.44$, 由于 $L/D > 100$, 表明茶树油凝胶无眼刺激性。

3.5 茶树油凝胶的皮肤刺激性

皮肤刺激性实验, 是指采用动物实验的方法来评价受试样品对人体皮肤刺激性大小, 包括急性皮肤刺激性和多次皮肤刺激性, 将受试样品一次剂量或多次剂量涂敷于健康无破损的动物皮肤上, 观察动物皮肤接触受试样品后所产生的局部可逆性炎症症状, 从而为药物对人体皮肤的安全性提供依据^[34]。由于茶树油凝胶涂敷于皮肤上, 可以通过透皮吸收给药, 因此本研究采用家兔急性皮肤刺激性与多次皮肤刺激性实验, 将茶树油凝胶均匀涂抹于动物背部皮肤, 然后用二层消毒纱布覆盖并以无刺激性胶布加以固定, 防止脱落而污染实验皮肤, 采用封闭实验, 考察并研究茶树油凝胶的安全刺激性。在家兔多次皮肤刺激性实验中, 观察时间的确定应足以满足观察到可逆或不可逆刺激作用全过程, 一般不超过 14 d。

在急性皮肤刺激性实验中, 一次给药后茶树油凝胶对家兔皮肤的刺激反应最高积分平均值为 0.125, 连续给药 14 d 观察期内, 茶树油凝胶对家兔皮肤的每天每只动物刺激反应平均积分为 0.036, 皮肤刺激强度积分均 < 0.5 , 家兔背部受试区皮肤均未见明显红斑和焦痂形成, 无水肿、充血、渗液、溃烂以及色素沉着等皮肤刺激性反应, 表明茶树油凝胶一次给药或多次给药后对家兔皮肤无刺激性, 为进一步研究与开发茶树油新剂型奠定基础。

参考文献

- [1] Carson C F, Hammer K A, Riley T V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1): 50-62.
- [2] Ninomiya K, Maruyama N, Inoue S, *et al*. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(6): 861-865.
- [3] 李娟, 李小瑞. 茶树油的性质及其应用 [J]. 日用化学工业, 2003, 33(5): 323-325.
- [4] 杜光, 郑恒, 宗凯. 茶树油化学成分及抗菌作用研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(8): 462-463.
- [5] 吴岷, 谢吉蓉, 宋琴, 等. 茶树油作为天然抗菌剂的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(21): 1803-1807.
- [6] 陶风云, 张新妙, 俞军, 等. 茶树油抗菌作用机理研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(5): 261-266.
- [7] Hammer K A. Treatment of acne with tea tree oil (*Melaleuca*) products: A review of efficacy, tolerability and potential modes of action [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 45(2): 106-110.
- [8] Pazyar N, Yaghoobi R, Bagherani N, *et al*. A review of applications of tea tree oil in dermatology [J]. *Int J Dermatol*, 2013, 52(7): 784-790.
- [9] 胡忆雪, 姚雷, 黄健, 等. 茶树油对 3 种痤疮致病菌的抑制作用研究 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2011, 29(1): 88-92.
- [10] 周南, 宋丹丹, 周建业. 茶树油在皮肤领域的研究及进展 [J]. 江西中医药, 2008, 39(310): 74-76.
- [11] 卢秀霞, 潘婷婷, 洪于琦, 等. 茶树油微乳凝胶的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1892-1900.
- [12] Carson C F, Riley T V. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil [J]. *Contact Dermatitis*, 2001, 45(2): 65-67.
- [13] Hammer K A, Carson C F, Riley T V, *et al*. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(5): 616-625.
- [14] 熊欣, 刘淑芝, 项佳音, 等. 新型载体经皮凝胶剂的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 244-249.
- [15] 申宝德, 沈成英, 徐玲霞, 等. 纳米混悬凝胶剂在中药经皮给药中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 5012-5018.
- [16] 赖宝林, 王利胜, 张升, 等. 中药凝胶剂的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 211-212.
- [17] Rehman K, Zulfakar M H. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40(4): 433-440.
- [18] 夏爱晓, 孙渊, 孟贤. 新型药物凝胶剂研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2015, 33(3): 205-208.
- [19] 杨柳, 王爱武, 刘帅. 凝胶剂研究概况及临床应用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(7): 147-150.
- [20] 王世荣, 李祥高, 刘东志, 等. 表面活性剂化学 [M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [21] 武华萍, 孙永强, 康保安. 非离子表面活性剂的结构与性能的关系 [J]. 日用化学品科学, 2012, 35(6): 17-21.
- [22] 郭红叶, 伊博文, 闫小平, 等. 新型辅料卡波姆在凝胶剂中应用现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 371-374.
- [23] 马维娜, 谷福根. 药用凝胶剂的研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2014, 17(12): 1624-1628.
- [24] 王敏, 薛晓东. 卡波姆凝胶剂的临床应用研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(6): 1078-1080.
- [25] Hayati F, Ghamsari S M, Dehghan M M, *et al*. Effects of Carbomer 940 hydrogel on burn wounds: An *in vitro* and *in vivo* study [J]. *J Dermatolog Treat*, 2018, 29(6): 593-599.
- [26] 陈双璐. 卡波姆在凝胶剂中的应用现状 [J]. 天津药学, 2007, 19(4): 68-71.
- [27] 卢毅, 张彤, 陶建生. 卡波姆在药剂学中的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(6): 457-460.
- [28] Pandita D, Kumari N, Lather V. A self-nanoemulsifying drug delivery system for poorly water soluble tolbutamide: Development, optimization and pharmacodynamic studies [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2017, 5(4): 285-300.
- [29] Tran T H, Guo Y, Song D, *et al*. Quercetin-containing self-nanoemulsifying drug delivery system for improving oral bioavailability [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(3): 840-852.
- [30] 黄维真, 宁小清, 梁红, 等. 白花九里明抗菌和抗炎作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 158-162.
- [31] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究 [J]. 食品工业, 2016, 37(11): 122-125.
- [32] Balls M, Botham P A, Bruner L H, *et al*. The EC/HO international validation study on alternatives to the draize eye irritation test [J]. *Toxicol In Vitro*, 1995, 9(6): 871-929.
- [33] 廖南英, 刘启德, 宓穗卿, 等. 溶血试验替代滴眼液眼刺激性试验的可行性研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 648-652.
- [34] 张建萍, 魏玉辉, 张国强, 等. 苦豆子总碱温度敏感型凝胶剂的皮肤刺激性及毒理学评价 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(10): 1180-1184.