

正交试验法优选康痔栓的醇沉工艺

王永林^{1,2} 尚荣国¹ 李康乐¹ 窦建卫¹

(1 西安交通大学药学院,西安,710061; 2 杨凌示范区医院药学部,西安,712100)

摘要 目的:通过正交试验筛选康痔栓的醇沉最佳工艺。方法:采用正交试验,以含醇量、药液相对密度、静置时间为考察因素,以盐酸小檗碱含量和出膏率为考察指标,优选醇沉工艺。结果:康痔栓的最佳醇沉工艺条件为:含醇量为60%,药液相对密度为1.10~1.20,静置时间24 h。结论:通过正交实验优选的康痔栓的醇沉工艺,确定了康痔栓的生产工艺合理、科学、可行。

关键词 康痔栓;生产工艺;正交试验;出膏率;盐酸小檗碱;高效液相色谱法;验证试验;工艺条件

Optimization of Alcohol Precipitation Process of Kangzhi Suppository by Orthogonal Test

Wang Yonglin^{1,2}, Shang Rongguo¹, Li Kangle¹, Dou Jianwei¹

(1 School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2 Department of Pharmacy, Yangling Demonstration Zone Hospital, Xi'an 712100, China)

Abstract Objective: To select the optimal alcohol precipitation of Kangzhi suppository by orthogonal test. **Methods:** The alcohol precipitation was optimized by orthogonal test using alcohol concentration, relative density and standing time as factors, with Berberine Hydrochloride and paste-forming rate as examining indexes. **Results:** The optimal conditions were as follows, alcohol concentration was 60%, relative density was 1.10-1.20 and standing time was 24 h. **Conclusion:** The optimized alcohol precipitation process of kangzhi suppository by orthogonal test determined that the productive technology was reasonable, scientific and feasible.

Key Words Kangzhi suppository; Productive technology; Orthogonal test; Paste-forming rate; Berberine hydrochloride; HPLC; Verification test; Process conditions

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.06.007

痔疮是一种目前发病率较高的疾病^[1],痔疮是人体直肠末端黏膜下和肛管皮肤下静脉丛发生扩张和屈曲所形成的柔软静脉团,称为痔,又名痔核、痔病、痔疾等。由于现代社会节奏较快,许多人精神一直处于紧张状态;同时伴随着生活水平的逐步提高,摄入的食物越来越精细,蛋白质、脂肪等的含量提高,这种生活方式造成饮食不合理;同时一些坏习惯使的排便时间延长,由于工作等的缘故长时间保持一种状态使肛垫中血管回流受阻从而出现瘀血或扩张,卫生意识淡薄造成肛周不洁等,都是直接或间接导致发病的原因。目前手术与药物是治疗痔疮的主要方式。但手术容易引起并发症,且周期较长,给患者带来的痛苦较大^[2-4],因此,药物治疗是一种较为理想的治疗方式。

中医认为痔的病因病机主要有饮食不节,过食辛辣,久坐负重,致湿热、燥热内生入里化热,下注大肠;或经络瘀滞等滞于肛门而发为痔。《医宗金鉴》

曰:“久泻久痢而生痔者”,久泻久痢故脾气亏虚,肺气亦虚,致大肠之气不足,故气血流注,湿浊聚于肛门发为痔。因此对痔疮治疗多主张清热解毒,凉血祛瘀。

康痔栓处方由黄柏、黄芩、大蓟、白及、当归、冰片、雷公藤等组成。具备清热除湿解毒,活血化瘀止痛,凉血消肿止血等功效,临床用于治疗内痔、混合痔湿热壅滞证。在必康制药科研基金的资助下,为探讨其最佳生产工艺,本实验采用正交实验法^[5-6],以盐酸小檗碱与出膏率为指标,筛选醇沉的最佳生产工艺。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 电子天平(日本岛津,型号:AUY120);超声波清洗机(深圳深华泰,型号:PS-40);分析天平(梅特勒-托利多,型号:AB135-S)等。

1.2 试剂 甲醇(天津市大茂化学试剂厂,批号:20180823);乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司,

基金项目:必康制药科研基金项目(2017bikangjijin-001)——康痔栓药效学及毒性试验研究

作者简介:王永林(1975.02—),男,硕士,副主任药师,研究方向:中药复方药效物质基础研究,E-mail:957431577@qq.com

通信作者:窦建卫(1968.11—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药复方药效物质基础研究,E-mail:djw@mail.xjtu.edu.cn

批号:20130503)其他试剂全部为分析纯。

1.3 分析样品 盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201613)购自中国食品药品检定研究院;黄柏、黄芩、大蓟、白及、当归、冰片等药材均购买于西安万寿路中药材市场,经西安交通大学药学院窦建卫副教授鉴定均为正品。供试品、阴性样品全部为自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶;乙腈-0.1% 磷酸水溶液(50:50);检测波长 265 nm。按盐酸小檗碱计算理论板数应该大于等于 4 000。

2.2 对照品溶液的制备 取一定量盐酸小檗碱,以甲醇溶液为溶剂,配制成浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 1 粒,切碎,称取约 0.2 g,准确称量,放置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,超声提取(250 W,40 KHz)20 min,放凉至室温,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 滤膜,为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备 按上述制备方法,取除黄柏外的阴性样品适量,制备阴性对照溶液。

2.5 专属性试验 对照品溶液(精确量取)10 μL,进行检测,获得色谱图,供试品与阴性对照溶液重复上述步骤。结果可知,在色谱峰相对应的位置上,阴性样品无色谱峰被检出,说明制剂中其他药材不会干扰盐酸小檗碱的测定。结果见图 1。

2.227 2 μg 范围内,盐酸小檗碱与峰面积有较好的线性关系。

2.7 中间精密度试验 取对照品溶液,进行实验(色谱条件如上),获得色谱图,色谱峰面积,以盐酸小檗碱峰面积进行考察,重复进样 6 次,计算 RSD 等于 0.46%,结果可知,该方法精密度良好。

2.8 供试品溶液稳定性试验 在 0 h 开始,每隔 2 h 进样 1 次,共进样 6 次,10 μL/次,获得色谱图,同时测定色谱峰面积,RSD 等于 0.59%。结果可知,在 10 h 内,供试品溶液稳定性良好。

2.9 重复性试验 按以上方法制备供试品溶液 6 样份,顺次分别取 10 μL 进行分析,获得色谱图,计算其中盐酸小檗碱的含量为 24.56 mg/粒,RSD = 1.01%。结果可知,此种方法有很好的重复性。

2.10 回收率试验 取 6 份一定量已知浓度的样品,各 0.1 g,依次分别加入 10 mL 容量瓶中,分别加以上盐酸小檗碱对照品约 1.20 mg,依以上方法制备、分析,获得色谱图,计算样品中平均回收率为 99.4%,RSD 为 0.8%。

2.11 样品测定结果

2.11.1 出膏率测定方法 按处方比例称取黄柏、黄芩、大蓟、白及、当归、冰片等全部药材,按上述条件安排试验,收集提取液,浓缩,定容至 1 000 mL,备用。精密量取各试验项下浓缩液 50 mL,分别置恒重好的干燥蒸发皿中水浴蒸干,置烘箱中烘 3 h(105 ℃),取出,迅速置干燥器中冷却 30 min,称重,计算出膏率。

2.11.2 醇沉工艺正交实验设计 醇沉的效果与含醇量(A)、药液相对密度(B)、静置时间(C)等因素有着至关重要的联系。为了选出对康痔栓最佳的醇沉工艺,采用 L₉(3⁴)正交设计表,以出膏率和盐酸小檗碱的含量作为考察指标,进行实验,其影响因素见表 1。

表 1 因素水平表			
水平	因素		
	A:含醇量(%)	B:药液相对密度	C:静置时间(h)
1	70	1.00 ~ 1.10	12
2	60	1.10 ~ 1.20	24
3	50	1.20 ~ 1.30	36

2.11.3 醇沉工艺正交实验结果 选择盐酸小檗碱的提取量与出膏率的综合评分作为此次试验的评价指标。盐酸小檗碱的含量权重系数定为 0.7,出膏量权重系数定为 0.3。醇沉工艺进行了 9 次试验,试验数据、方差分析结果见表 2、3。

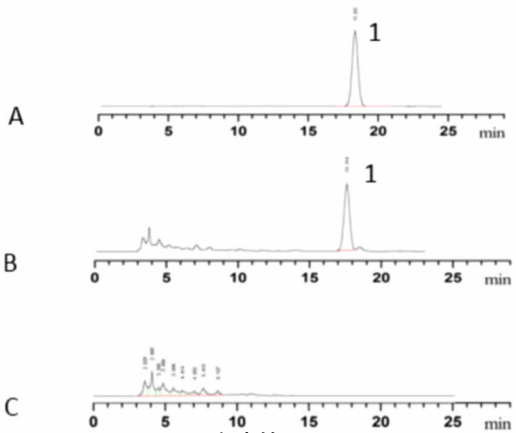


图 1 康痔栓 HPLC 图

注:A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 盐酸小檗碱

2.6 线性关系考察 称取一定量盐酸小檗碱对照品,用甲醇溶液作为溶剂,制备为浓度为 9.28、18.56、37.12、55.68、92.8、111.36 μg/mL 的溶液,定量吸取上述溶液 20 μL 进行实验,获得色谱图及峰面积积分值,分析得到其回归方程: y = 3 805.3x + 5 448 (r = 0.999 9), 在 0.185 6 ~

表2 醇沉L₉(3⁴)正交试验表

试验号	列号				测定结果		评价指标 综合评分
	A	B	C	D	出膏率 (%)	盐酸小檗碱 含量(mg/g)	
1	1	1	1	1	14.00	12.71	0.880
2	1	2	2	2	14.30	14.45	0.922
3	1	3	3	3	14.10	13.02	0.890
4	2	1	2	3	13.80	17.47	0.943
5	2	2	3	1	13.20	19.57	0.946
6	2	3	1	2	13.30	18.56	0.936
7	3	1	3	2	12.20	15.05	0.828
8	3	2	1	3	12.30	14.93	0.831
9	3	3	2	1	12.10	16.13	0.840
K1	0.897	0.884	0.882	0.889			
K2	0.942	0.900	0.902	0.895			
K3	0.833	0.889	0.888	0.888			
R	0.109	0.016	0.020	0.007			

表3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F值	P值
A	0.018 3	2	0.009 1	91	<0.05
B	0.000 4	2	0.000 2	2	
C	0.000 4	2	0.000 2	2	
D	0.000 2	2	0.000 1		

注:F_{0.05}(2,2)=19.0,F_{0.01}(2,2)=99.0

2.11.4 结果分析 由上述数据分析可得,对康痔栓提取工艺的影响顺序为A>C>B,即含醇量>静置时间>药液相对密度。方差分析结果表明:含醇量对评价指标有显著性的影响,由正交试验结果可以看出,最佳工艺为A2B2C2,即含醇量为60%,药液相对密度为1.10~1.20,静置时间24 h。

2.11.5 验证实验 按处方量称取各药材,共3份,按照所选提取条件以及醇沉条件试验,药液分别浓缩、醇沉,取上清液,定容至1 000 mL,取50 mL按照正交实验出膏率测定方法测定出膏率;再取100 mL按照水煎煮正交试验项下含量测定方法进行测定,三次验证试验表明,结果接近或者高于正交表中最优值,说明优选的条件基本可行。

3 讨论

康痔栓处方是在古方“痔核散”的基础上增加止血药大蓟、白及而成的,全方由黄柏、黄芩、大蓟、白及、当归、冰片、雷公藤等组成。方中黄柏,功能擅于清热燥湿,泻火解毒。《本草新编》^[7]谓:“黄柏,味苦、微辛,气寒,阴中之阴,降也。无毒。乃足少阴妙药,又入足太阳。专能退火解热,消渴最效,去肠风,止血痢,逐膀胱结热”;《本草经疏》中记载:“黄檗,主五脏肠胃中结热。盖阴不足,则热始结于肠胃;……肠痔漏,亦皆湿热伤血所致;……乃足少阴

肾经之要药,专治明虚生内热诸证,功烈甚伟,非常药可比也”。

黄芩,具有泻实火、除湿热、止血、安胎的功效^[8]。《本草新编》谓:“黄芩,味苦,气平,性寒,可升可降,阴中微阳,无毒。入肺经、大肠。退热除烦,泻膀胱之火,止赤痢,消赤眼,善安胎气,解伤寒郁蒸,润燥,益肺气”。野菊花,功能清热解毒,疏风平肝^[9]。《本草汇言》中记载:“破血疏肝,解疔散毒。主妇人腹内宿血,解天行火毒丹疔。洗疮疥,又能去风杀虫”。《浙江中药手册》中说其可排脓解毒,消肿止痛。治痈肿疔毒,天疱湿疮。《现代实用中药》中记载,用于痈疽化脓病。大蓟,功能凉血止血,行瘀消肿^[10]。《日华子本草》中记载:大蓟“叶,治肠痈,腹藏瘀血,血运扑损,可生研,酒并小便任服;恶疮疥癣,盐研罨敷”。《滇南本草》中记载:“其消瘀血,生新血,止吐血、鼻血。治小儿尿血,妇人红崩下血,生补诸经之血,消疮毒,散瘰癧结核,疮痈久不收口者,生肌排脓”。《玉揪药解》中记载可治金疮。《医林纂要》中记载:“坚肾水,去血热,泄逆气。治肠风,肠痈”。《福建民间草药》中记载:“凉血止血,消炎退肿。治肺热咳血,热结血淋,疔疖疮疡,漆疮,汤火烫伤”。白及,功能收敛止血;消肿生肌^[11]。《本草纲目》中有白及:“性涩而收,故能入肺止血,生肌治疮也”。《日华子本草》中记载:“止惊邪、血邪,痢疾,赤眼,症结,发背,瘰癧,肠风,痔瘻,刀箭疮扑损,温热疟疾,血痢,汤火疮,生肌止痛,风痹”。当归,味甘、辛、苦、性温。归肝、心、脾经。功能补血和血,调经止痛,润燥滑肠^[12]。临床上主要用于血虚诸证;月经不调、经闭、痛经、癥瘕结聚、崩漏、虚寒腹痛、痿痹、肌肤麻木、肠燥便难、赤痢后重、痈疽疮疡、跌扑损伤。冰片,通诸窍,散郁火,去翳明目,消肿止痛^[13]。可用于疮疡肿痛,疮溃不敛,水火烫伤。本品有清热解毒、防腐生肌作用,故外用清热消肿、生肌敛疮方中均用冰片。雷公藤功能祛风除湿;活血通络;消肿止痛;杀虫解毒,用于治疗类风湿性关节炎;风湿性关节炎;红斑狼疮;口眼干燥综合征;白塞病;湿疹;银屑病;麻风病;疥疮;顽癣等^[14]。《湖南药物志》谓其可:“杀虫,消炎,解毒”。枯矾,擅长解毒杀虫,清热消痰,燥湿止痒。用于湿疹,疥癣,癩痢,中风,喉痹^[15]。外用可解毒止痒,常制成散剂、洗剂、含嗽剂、注射剂使用,高浓度具有腐蚀性,用于胥肉,痔疮,脱肛。如消痔液等。

纵观全方,黄柏、黄芩以清热燥湿、泻火解毒为主,野菊花、大蓟、白及三味药材以止血、祛瘀为主,

当归、冰片、枯矾针对病症发挥其抗菌、镇痛作用。总之该方谨守病机,配伍精妙,药著力宏。全方共奏燥湿、止血、镇痛之功效。临床用于热解毒,祛湿消肿,化瘀止痛,凉血止血。用于内痔、混合痔湿热壅滞证。

栓剂为古老剂型之一,我国使用栓剂已有悠久的历史。《史记·仓公列传》、张仲景的《伤寒论》、晋·葛洪的《肘后备急方》中都有类似栓剂的记载。在公元前 1550 年的埃及《伊伯氏草本》中也有记载。栓剂具有以下优点:1) 药物不受胃肠 pH 或酶的破坏,在一定程度上避免了肝脏的首过效应,生物利用度高,对肝的不良反应小。2) 避免了药物对胃黏膜的刺激,干扰因素少,能促进药物吸收。3) 直接作用于病灶、起效快,作用时间长。本方具有清热解毒,祛湿消肿,化瘀止痛,凉血止血。用于内痔、混合痔湿热壅滞证。栓剂在腔道内缓缓融解从而发挥治疗作用,产生持久的药效,直接接触病灶,考虑到本方的功能主治和发病部位的特点以及栓剂的优点,选择栓剂为本方的制剂形式。

本实验对康痔栓的水提物进行醇沉的研究,同时以出膏率和盐酸小檗碱为考察指标。通过实验得出,含醇量是影响醇沉效果的主要因素。且最终确定康痔栓的醇沉工艺为:即含醇量为 60%,药液相对密度为 1.10~1.20,静置时间 24 h。

为了便于该制剂的临床研究与应用,本实验根据处方所含药物的性质,采用对应的工艺,且对各工艺的参数进行考察,经过三批中试试验研究,实验结果表明,三批中试试验结果均符合相关标准,制备工艺重现性好,具有可行性,可以作为放大生产的条件依据,经过对中试产品的质量检验,符合药典及质量

标准的规定,故制剂工艺是可行的。

参考文献

- [1] 刘蔚,王继宁,张小元,等. 我国西北地区成人常见肛肠疾病流行病学调查及相关因素分析[J]. 实用预防医学,2017,24(3):333-337.
- [2] 杜蕊,江洪亮,梁沛华. 三期内痔患者性生命质量调查[J]. 中国性科学,2017,26(7):40-42.
- [3] 谢冬梅,肖莉,林方兰,等. 中药熏洗联合穴位按摩在内痔外治法中的应用[J]. 光明中医,2017,32(13):1898-1900.
- [4] 钟小娟. 疼痛护理在痔疮手术患者中的应用研究[J]. 中国当代医药,2017,24(18):169-171.
- [5] 陈衍斌,张晓红,刘峰. 参梅健胃胶囊制备工艺研究[J]. 世界中医药,2017,12(1):168-171.
- [6] 毛莹,李东霞,夏春丽. 正交设计法优选忍冬藤中绿原酸提取工艺[J]. 世界中医药,2016,11(7):1337-1339.
- [7] 明·李中梓著,王体校注. 本草新编[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:191-192.
- [8] 郝翠,段文娟,赵恒强,等. 黄芩配方颗粒与标准汤剂体外抗炎活性的比较[J]. 中国新药杂志,2018,27(11):1309-1314.
- [9] 樊高洁,李淑敏,张珊,等. 野菊花的质量标准研究[J]. 中草药,2017,48(19):4073-4076.
- [10] 陈瑞生,陈相银,贾王俊. 止血良药大蓟和小蓟[J]. 首都食品与医药,2016,23(9):64-64.
- [11] 马先杰,崔保松,韩少伟,等. 中药白及的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(8):1578-1584.
- [12] 潘菊华,李多娇,郑军,等. 当归抗抑郁作用及配伍应用[J]. 世界中医药,2015,10(2):290-292,296.
- [13] 顾永卫,杨盟,刘继勇. 雷公藤外用制剂的临床应用研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2018,42(4):374-376.
- [14] 张历元,李元文,林欢儿,等. 中药冰片的商品种类与现代药理学研究进展[J]. 世界中医药,2018,13(4):1025-1029,1034.
- [15] 何莉莎,叶茹,逢冰,等. 全小林运用夏枯草枯矾治疗突眼验案 1 则[J]. 上海中医药杂志,2015,49(10):32-34.

(2018-01-12 收稿 责任编辑:王明)