

正交试验法优选硝英洗剂制备工艺研究

席永宽, 张贺廷*, 丁小凡, 张 虎, 周 稳, 李 磊

阜阳市中医医院制剂室, 安徽 阜阳

收稿日期: 2022年6月22日; 录用日期: 2022年7月18日; 发布日期: 2022年7月26日

摘 要

目的: 以盐酸小檗碱为考察指标建立硝英洗液正交试验优化工艺。方法: 采用HPLC法, 以Wonda Sil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1%磷酸溶液(50:50)为流动相, 流速为1.0 mL/min, 检测波长为265 nm, 柱温为30℃; 用正交试验法优化对硝英洗剂的提取工艺优化。结果: 盐酸小檗碱在0.078125 mg/mL~0.125 mg/mL范围内, 线性关系良好, 回归方程 $y = 19947x - 8.6951$, $R^2 = 1$; 盐酸小檗碱平均加样回收率($n = 6$)为99.19% (RSD = 1.45%); 正交试验结果为加水12倍量水, 煎煮3次, 每次45 min。结论: 本实验建立以盐酸小檗碱为最佳工艺的硝英洗液提取工艺, 该工艺方法合理、工艺可靠, 可以作为大生产的提取条件。

关键词

硝英洗剂, 正交试验, 提取工艺, 盐酸小檗碱

Study on the Optimization of the Extraction Technology for Xiaoyin xiji by Orthogonal Experiment

Yongkuan Xi, Heting Zhang*, Xiaofan Ding, Hu Zhang, Wen Zhou, Lei Li

Fuyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fuyang Anhui

Received: Jun. 22nd, 2022; accepted: Jul. 18th, 2022; published: Jul. 26th, 2022

Abstract

Objective: To establish the orthogonal test optimization process of Xiaoyin xiji with the small sacilline hydrochloride as the inspection index. **Methods:** Using HPLC method, the color column

*通讯作者。

of Wonda Sil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, and the acetylene-0.1% phosphoric acid solution (50:50) for the flow phase, flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength of 265 nm, column temperature of 30 degrees C, with orthogonal test method to optimize the extraction process of Xiaoyin xiji. Results: Small carbapenum hydrochloride at 0.078125 mg/mL to 0.125 mg/mL range, the linear relationship is good, and the regression equation $y = 19947x - 8.6951$, $R^2 = 1$. The average sample recovery was 99.19% (n = 6), RSD was 1.45%. Conclusion: In this experiment, the Xiaoyin xiji extraction process with hydrochloric acid as the best process is established, which is reasonable and reliable, and can be used as the extraction condition for large-scale production.

Keywords

Xiaoyin xiji, Orthogonal Experiment, Extraction Process, Berberine Hydrochloride

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

中药坐浴在治疗肛肠性疾病中具有独特的疗效, 研究发现, 术后应用中药坐浴能有效的提高伤口愈合率[1], 同时中药坐浴在联合针灸在治疗肛门其他相关疾病中也具有较好的疗效, 如肛门瘙痒、肛门湿疹、肛门疼痛等疾病[2] [3] [4] [5]。硝英洗剂原名肛肠洗剂, 为阜阳市中医医院市级重点专科肛肠科协定处方, 方中由金银花、蒲公英、芒硝、延胡索、黄柏等 12 味中药组成, 该方具有清热解毒, 活血止痛的功效。临床上用于炎性外痔, 血栓外痔, 肛痈, 肛瘘的术后熏洗坐浴, 临床疗效较好[6]。方中以芒硝、黄柏、蒲公英为君药, 黄柏具有较强的抑菌、抗炎等功效[7] [8], 蒲公英清热解毒、消肿散结; 辅以乳香、没药、赤石脂活血定痛, 消肿生肌, 敛疮生肌等。

为了有效地控制我院硝英洗剂的质量, 保证临床药效, 对硝英洗剂的提取工艺进行研究, 以硝英洗剂中黄柏中盐酸小檗碱为考察指标, 采用正交试验对其提取工艺进行优化, 以高效液相色谱法对硝英洗剂中黄柏的成分盐酸小檗碱。

2. 仪器与试药

2.1. 仪器

Agilent1260II 高效液相色谱仪; Wonda Sil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 梅特勒 ME55 十万分之一分析天平, JK-DY300 型超声波清洗器(输出功率 300 W, 工作频率 40 kHz); 上海市力辰邦西数显恒温水浴锅。

2.2. 试药

对照品盐酸小檗碱(批号 110713-202015, 纯度 85.9%)及对照药材均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2.3. 色谱条件选择[9]

参照 2020 版《中国药典》中黄柏中盐酸小檗碱色谱条件: 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(50:50);

流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 265 nm; 柱温: 30°C; 进样量 10 μ L。

2.4. 对照品溶液的制备

精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 精密称定(12.5 mg), 加 50%甲醇溶液至 100 mL 量瓶定容, 超声处理 30 min, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 置于 5°C 冰箱中备用。

2.5. 供试品溶液的制备

用移液管移取硝英洗剂样品 5 mL 溶液转移至 100 mL 容量瓶, 加 80 mL 50%甲醇溶液, 超声 40 min; 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。

2.6. 阴性对照溶液的制备

用移液管分别移取不含黄柏的硝英洗剂; 采用 3.3 制备方法制备。

2.7. 专属性实验

精密吸取对照品溶液、硝英洗液样品溶液、阴性对照品溶液各 10 μ L 注入高效液相色谱仪进行测定。色谱峰结果显示, 对照品溶液和供试品溶液盐酸小檗碱种成分的保留时间一致, 且阴性对照品溶液无干扰, 表明该方法专属性良好, 见图 1。

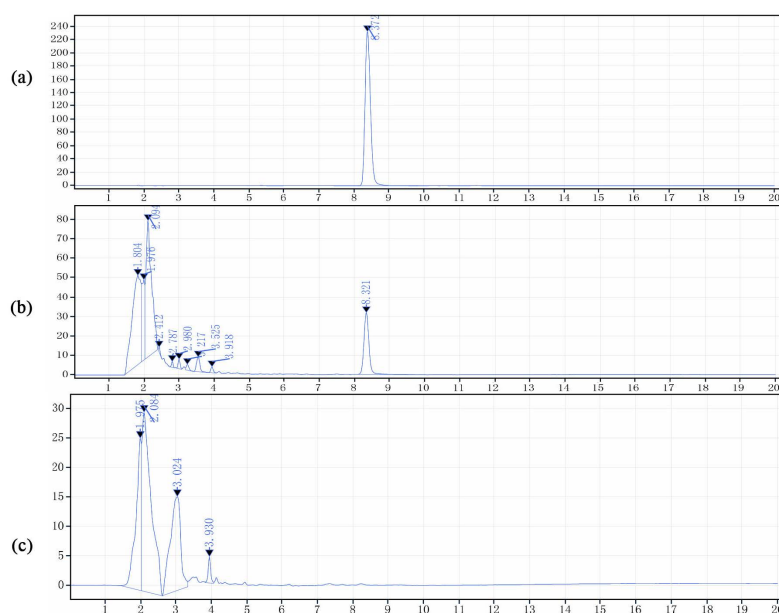


Figure 1. HPLC chromatograms of reference substance (a) Berberine hydrochloride, (b) sample, (c) negative sample

图 1. (a) 盐酸小檗碱, (b) 硝英洗液样品, (c) 阴性样品

2.8. 线性关系

分别吸取“2.2”项下 0.078125 mg/ml、0.01563 mg/ml、0.03125 mg/ml、0.0625 mg/ml、0.125 mg/ml 的盐酸小檗碱对照品溶液进样, 测定峰面积。以进样量(X, mg/mL)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 制备标准曲线。得盐酸小檗碱的回归方程 $y = 19947x - 8.6951$, $R^2 = 1$, 盐酸小檗碱在 0.078125 mg/ml~0.125 mg/ml 范围内, 线性关系良好。

2.9. 稳定性实验

取同一样品溶液,按照样品溶液制备方法制备,分别在 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h 进样,按照上述色谱条件进样,根据所得峰面积计算盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 1.18%,说明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10. 精密度考察

精密吸取同一盐酸小檗碱对照品溶液,连续进样 6 次,计算盐酸小檗碱物质峰面积的 RSD 为 0.12%,表明仪器精密度良好。

2.11. 重复性实验

精密称取同一供试品样品,平行 6 份,按照样品溶液制备方法制备及进样,盐酸小檗碱含量的 RSD 为 0.68%,表明该方法的重复性良好。

2.12. 加样回收率考察

精密移取同批样品 6 份(批号 20210801),每份 5 mL,精密称重,分别精密加入浓度为 0.078125 mg/mL 盐酸小檗碱对照品 80 ml,密塞称定重量,超声 30 分钟,放冷,再称定重量,用 50%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,滤液作为供试品溶液;按含量测定项下的方法测定供试品溶液中盐酸小檗碱含量,结果表明 RSD 为 1.45%。照“2.6.1 项”下色谱条件测定,计算其加样回收率,详见表 1。

Table 1. The results of recovery tests (n = 6)

表 1. 加样回收率的实验(n = 6)

编号	称量量(mg)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率/%	平均值/%	RSD
1	5.0981	0.5836	0.6250	1.2061	99.79		
2	5.0872	0.6086	0.6250	1.2141	98.42		
3	5.1016	0.5839	0.6250	1.2092	100	99.19	1.45%
4	5.0984	0.5798	0.6250	1.1879	98.60		
5	5.0915	0.5805	0.6250	1.1996	99.51		
6	5.1030	0.6242	0.6250	1.2331	98.71		

3. 正交试验

3.1. 正交试验设计

以加水量、煎煮时间、煎煮次数进行正交试验。采用 $L^3(9)$ 分析组合,因素水平见表 2,试验设计结果见表 3。

Table 2. Factors and levels of orthogonal tests

表 2. 因素水平表

因素水平	A	B	C
1	8	45	1
2	10	60	2
3	12	75	3

Table 3. The results of orthogonal test (n = 3)**表 3.** 正交试验结果表(n = 3)

序号	A	B	C	D	盐酸小檗碱总含量(mg)
1	8	45	1	1	24.19
2	8	60	2	2	31.59
3	8	75	3	3	37.05
4	10	45	3	2	75.14
5	10	60	1	3	21.92
6	10	75	2	1	23.74
7	12	45	2	3	69.01
8	12	60	3	1	65.81
9	12	75	1	2	38.73
K1	30.94	56.11	37.91	28.28	
K2	40.27	39.77	48.48	41.45	
K3	57.85	33.17	42.66	59.33	
R	26.91	22.94	10.57	31.05	

3.2. 盐酸小檗碱含量极差分析

直观分析可以看出：以盐酸小檗碱含量为考察指标，加水量 $12 > 10 > 8$ ，煎煮时间 $45 > 75 > 60$ ，煎煮次数 $3 > 2 > 1$ 。对盐酸小檗碱含量进行极差分析，如表 4 所示。

Table 4. The results of variance analysis**表 4.** 盐酸小檗碱含量极差分析表

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值
A	2	0.05	0.02	6.66	0.13
B	2	0.04	0.02	4.98	0.17
C	2	0.06	0.03	8.67	0.10

从极差表可以看出，对盐酸小檗碱含量影响顺序为：煎煮次数 > 煎煮时间 > 加水量，其中最优方案组合为煎煮次数 3、煎煮时间 45、加水量 12。

3.3. 盐酸小檗碱含量趋势图

从各因素对极差的趋势图(图 2)，可以看出，随着加水量的增大盐酸小檗碱含量增大，随着煎煮时间的增大，盐酸小檗碱含量先减小后增大；随着煎煮次数的增大，盐酸小檗碱含量先减小后缓慢减小。

3.4. 最佳水提工艺的验证

按以上最佳水提工艺，即加入处方量 12 倍量水，提取 3 次，每次 45 min，测定小檗碱平均含量(表 3)。由表 5 的验证试验结果可知，优化后的水提工艺可行、稳定、重现性好，可应用于大量生产。

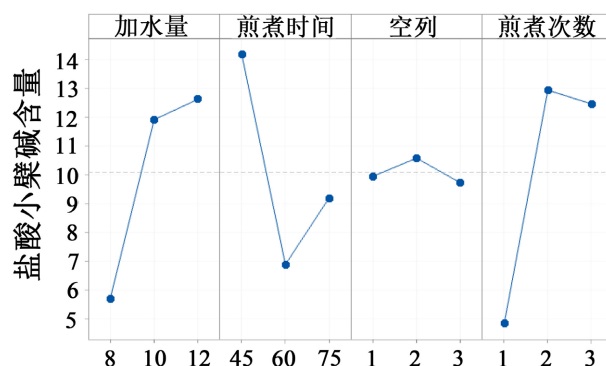


Figure 2. Sample content trend chart of Berberine hydrochloride
图 2. 盐酸小檗碱含量趋势图

Table 5. The optimum conditions of Xiaoying xiye
表 5. 硝英洗液最佳工艺验证

批号	盐酸小檗碱含量(mg/g)
1	0.079
2	0.081
3	0.084

4. 讨论

硝英洗液处方中黄柏具有较强的抗炎作用，现代药理研究表明黄柏中盐酸小檗碱具有较强的抗炎、抗病毒作用[10][11]。同时，方中金银花、蒲公英也具有抗炎作用[12][13]，但在研究中发现，金银花及蒲公英中所含的咖啡酸及绿原酸为苯丙素类物质，在处方中其它药物也具有绿原酸及咖啡酸类，阴性干扰较大，而处方黄柏中盐酸小檗碱阴性无干扰，故本研究采用黄柏中盐酸小檗碱作为最终质量标志物，并以此进行工艺考察。通过正交试验考察发现，盐酸小檗碱的转移率及稳定均较好，可以作为硝英洗液定量标准。

在工艺考察中发现，本处方中有芒硝及矿石类物质赤石脂，赤石脂具有敛疮生肌功效，但提取后溶液静置后赤石脂会沉降在底部，从而对出膏率及相对密度的测定产生一定影响，本研究在考察相对密度时，将硝英洗液进行摇匀后在进行测定，以达到相对密度测定的稳定性。同时，在浓缩工艺研究中发现，不同浓缩温度对盐酸小檗碱的影响差异不大，考虑到实际生产中可能应为水压导致浓缩温度变化，故本研究最终的浓缩温度定在 65℃~70℃ 之间，以便更好的控制质量和生产。

基金项目

阜阳市卫健委科研课题(FY2019-079)。

参考文献

- [1] 杨豪杰, 刁海彦, 刘华. 痔术后中药外治疗效的 Meta 分析[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(12): 2465-2473.
- [2] 唐伟峰, 李华, 陶冶, 唐晓军, 丁佳妮, 任盛静. 中药坐浴联合针刺治疗功能性肛门直肠痛临床研究[J]. 山东中医杂志, 2020, 39(10): 1060-1064.
- [3] 胡占起. 中药坐浴联合他克莫司治疗肛周湿疹疗效观察[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(6): 180-183.

-
- [4] 兰波, 季英, 傅跃权. 混合痔内痔套扎、外痔切除术后患者使用肛肠熏洗剂的临床影响分析[J]. 内蒙古中医药, 2021, 40(7): 40-42.
- [5] 马丽娟, 谭康联, 张思奋, 梁学敏. 针刺联合中药熏洗坐浴对肛肠疾病术后疼痛疗效的 Meta 分析[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(5): 62-68.
- [6] 张进. 中药熏洗治疗肛门病术后水肿疗效观察[J]. 中医药临床杂志, 2011, 23(1): 46.
- [7] 高妍, 周海芳, 刘朵, 钱芳. 黄柏化学成分分析及其药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(4): 207-209.
- [8] 冯媛, 牛敏格, 张清清. 关黄柏化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2021, 23(8): 1486-1498.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. 305-306
- [10] 陈凯, 王月亮, 王佳奇, 丁传波, 宋明铭, 刘文丛, 等. 黄连乙醇提取物与盐酸小檗碱体外抗炎对比研究[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(5): 684-687.
- [11] 邹欣, 王定坤, 李芬, 赵云斌, 王开富. 分子模拟和生物学效应结合研究盐酸小檗碱抗 AchE 与胆碱能抗炎机制相关性[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(1): 46-49, 后插 2.
- [12] 赵小梅, 杨志军, 袁文珺, 吴晶. 正交试验优选苦柏洗剂提取工艺研究[J]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33(4): 40-43.
- [13] 杨超, 闫庆梓, 唐洁, 夏伯侯, 林丽美, 贺庆芝, 等. 蒲公英挥发油成分分析及其抗炎抗肿瘤活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7): 3106-3111.