

◇ 药学研究 ◇

盆腔炎灌肠合剂的提取工艺研究

张华妮^{1,2},李文芳¹,朱少铭²,郑金红²

(1. 武汉科技大学医学院公共卫生学院,湖北 武汉 430065;

2. 十堰市中西医结合医院药剂科,湖北 十堰 442000)

摘要:目的 优选盆腔炎灌肠合剂提取工艺。方法 以收膏率和总酚酸作为评价指标,通过正交试验优选盆腔炎灌肠合剂的提取工艺条件。结果 最佳水提取工艺条件为 $A_2B_1C_2$,即提取2次,料液比1:12,每次提取1 h。结论 优选出的提取工艺稳定,主要有效成分转移率高,为盆腔炎灌肠合剂的成型工艺研究奠定了基础。

关键词:正交试验;盆腔炎灌肠合剂;提取工艺;总酚酸

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.03.006

Study on the extraction technology of enema mixture for pelvic inflammatory disease

ZHANG Huani^{1,2}, LI Wenfang¹, ZHU Shaoming², ZHENG Jinhong²

(1. School of Public Health, Wuhan University of Science & Technology Medical School, Wuhan, Hubei 430065, China;

2. Department of Pharmacy, Shiyan Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of enema mixture for pelvic inflammatory disease (PID). **Methods** The extraction technology of enema mixture for PID was optimized by orthogonal test, evaluated by the extraction rate and the total phenolic acid. **Results** The best water extraction process condition was ($A_2B_1C_2$), that is, being extracted twice and the process lasted 1 hour with the solid-liquid ratio of 1:12. **Conclusions** The optimized extraction process is stable, with a high transfer rate of main effective components, which lay the foundation for the forming process of enema mixture for PID.

Keywords: orthogonal test; enema mixture for PID; extraction technology; total phenolic acid

盆腔炎是指女性内生殖器,包括子宫、卵巢、输卵管及其周围的结缔组织、盆腔腹膜发生的炎症,

已婚女职工中发病率为0.25%^[1],有急性与慢性之分。慢性盆腔炎临床以下腹坠胀疼痛、月经异常、异位妊娠为特点,该病有44.4%出现不孕症^[2]。近年不孕率逐渐升高,加剧年出生人口减少,因此寻找疗效好且副作用小的盆腔炎治疗药物对提高女

基金项目:十堰市科研立项项目(17Y70)

通信作者:李文芳,女,教授,硕士生导师,研究方向:公共营养学,
E-mail:Li-WF@163.com

[11] 李真玉,赵华杰,赵君,等.血清Presepsin(sCD14-T)对脓毒症早期诊断价值及预后意义[J].中华急诊医学杂志,2016,25(7):896-902.

[12] PUGNI L, PIETRASANTA C, MILANI S, et al. Presepsin (Soluble CD14 Subtype): Reference ranges of a new sepsis marker in term and preterm neonates[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0146020.

[13] MUSSAP M, PUXEDDU E, PUDDU M, et al. Soluble CD14 subtype (sCD14-ST) presepsin in premature and full term critically ill newborns with sepsis and SIRS[J]. Clin Chim Acta, 2015, 451(Pt A): 65-70.

[14] 陈忠年. 妇产科病理学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1996:341-344.

[15] BENITZ WE, WYNN JL, POLIN RA. Reappraisal of guidelines for management of neonates with suspected early-onset sepsis[J]. J Pediatr, 2015, 166(4): 1070-1074.

[16] OZDEMIR AA, ELGORMUS Y. Diagnostic value of Presepsin in

detection of early-onset neonatal sepsis[J]. Am J Perinatol, 2017, 34(6): 550-556.

[17] MONTALDO P, ROSSO R, SANTANTONIO A, et al. Presepsin for the detection of early-onset sepsis in preterm newborns[J]. Pediatr Res, 2017, 81(2): 329-334.

[18] TOPCUOGLU S, ARSLANBUGA C, GURSOY T, et al. Role of presepsin in the diagnosis of late-onset neonatal sepsis in preterm infants[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 29(11): 1834-1839.

[19] AURITI C, FISCARELLI E, RONCHETTI MP, et al. Procalcitonin in detecting neonatal nosocomial sepsis[J]. Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition, 2012(5): F368-F370.

[20] POGGI C, BIANCONI T, GOZZINI E, et al. Presepsin for the detection of late-onset sepsis in preterm newborns[J]. Pediatrics, 2015, 135(1): 68-75.

(收稿日期:2017-06-09,修回日期:2017-07-21)

性生殖健康和延缓人口老龄化进程有重要意义。盆腔炎的传统治疗以内服中药为主,随着医疗技术的进步,中药保留灌肠外治法日益受到广大医护和患者喜爱,应用范围也从妇科疾病扩大到直肠炎、肠梗阻、慢性肾衰竭、肝胆疾病等。盆腔炎灌肠合剂是十堰市中西医结合医院总结多年临床经验,由野菊花、蒲公英、紫花地丁、红花等 10 味中药加工而成的灌肠用合剂,有清热解毒、活血化瘀、消肿散结功效,现用于治疗慢性盆腔炎、宫颈癌放射性肠炎、子宫内膜异位症、不孕症、异位妊娠等疾病,应用多年,患者普遍反映效果满意。一直以来,该合剂的生产过程依靠药工经验把握,质量稳定性和均一性欠佳,为建立一套规范化的生产工艺,稳定制剂质量,笔者建立了一种适用于基层医院快速测定盆腔炎灌肠合剂总酚酸和收膏率的方法,用正交实验法筛选出最佳水提取生产工艺,现将结果报道如下。

1 材料

1.1 仪器与设备 UV2401 紫外分光光度计(日本岛津公司);SQP 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);DLSB-5/20 低温冷却液循环泵(河南宇科自动化仪器仪表设备有限公司);GZX-GF101-2-BS-Ⅱ 电热恒温鼓风干燥箱(上海贺德实验设备有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(金坛市天竟实验仪器厂);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);ZNHW-//智能恒温电热套(金坛市荣华仪器制造有限公司)。

1.2 试剂与材料 绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110753-200413),处方:当归(批号 146220,产地甘肃)、赤芍(批号 140305,产地黑龙江)、黄柏(批号 140302,产地吉林)饮片均购自亳州市宏宇中药饮片有限公司。红花(批号 20151001,产地新疆)、蒲公英(批号 20151201,产地湖北)和桃仁(批号 20160101,产地湖北)饮片均购自十堰宏康中药材有限公司。牡丹皮(批号 141201,产地安徽)和鸡血藤(批号 140401,产地湖北)饮片购自湖北清大中药饮片有限公司。紫花地丁(批号 20150501,产地湖北)和野菊花(批号 20150901,产地湖北)饮片均购自湖北神农本草中药饮片有限公司,甲醇、乙醇为分析纯,蒸馏水自制。

2 方法与结果

2.1 处方与工艺流程 (1)处方:当归 100 g、赤芍 100 g、牡丹皮 100 g、桃仁 100 g、红花 150 g、鸡血藤 150 g、黄柏 150 g、蒲公英 150 g、野菊花 150 g、紫花地丁 150 g;(2)处方分析:本方剂是在桃红四物汤基础上加减。将上述药材加 12 倍冷水浸泡 2 h,大火烧

开,小火煮 1 h,过滤;二煎加入 3 倍冷水,大火烧开,小火煮 1 h,过滤;合并 2 次过滤液,浓缩成清膏,相对密度 $\rho = 1.10 \sim 1.18 (60\text{ }^\circ\text{C})$,过滤,分装为每瓶 100 mL,密封,121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 15 min,1 ~ 3 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.2 检测方法

2.2.1 标准曲线的绘制 精密称取绿原酸对照品 6.5 mg,甲醇定容至 10 mL,配成 $650\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓溶液,分别吸取适量对照品溶液,置于 100 mL 容量瓶,用蒸馏水定容,混匀,配成浓度分别为 3.25、6.50、9.75、13.00、19.50、26.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的绿原酸溶液,此为标准系列溶液。将标准溶液在 270 ~ 370 nm 波长范围扫描测定绿原酸的最大吸收波长,在最大波长处测定吸光度。以绿原酸对照品的浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 为横坐标、以其吸光度为纵坐标绘制标准曲线,求出相应的回归方程。对绿原酸标准溶液的波长扫描结果显示,绿原酸最大吸收波长在 326 ~ 327 nm,参考文献[3],选定测定波长为 326 nm。标准曲线结果表明,绿原酸浓度在 3.25 ~ 26.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内绿原酸与其吸光度值呈良好的线性关系,线性方程为 $A = 0.04619C - 0.05234$, $r = 0.9972$,结果见图 1。

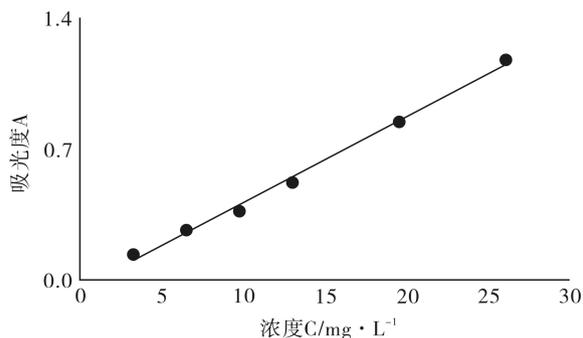


图 1 绿原酸标准曲线

2.2.2 收膏率的测定 按处方比例称取药材,按照正交实验条件提取样品,取各工艺提取物 1 000 mL,加热回流后浓缩至相对密度为 1.13 ($60\text{ }^\circ\text{C}$)。精密称取总滤液 20% 至已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后移至烘箱中,于 105 $^\circ\text{C}$ 干燥至恒重 N。同时按照处方比例称取饮片,置于干燥至恒重的蒸发皿中,于 105 $^\circ\text{C}$ 干燥 5 h,称定重量,继续干燥 1 h,称重,直至恒重 M。以干燥品计算收膏率。

2.2.3 总酚酸含量的测定 (1)绿原酸对照品的制备:精密称取绿原酸对照品适量,置 1 000 mL 的容量瓶中,加适量的甲醇溶解后,加水至刻度,摇匀,即得;(2)供试品溶液的制备:精密量取样品溶液 1 mL,置于 1 000 mL 量瓶中,在 326 nm 测定吸光

度,计算灌肠剂中总酚酸含量。

2.3 单因素试验设计(预试验) 查阅相关文献[4],为方便实际应用,同时考虑到温度过高影响药材的稳定性,会造成有效成分降低,考察料液比(1:6、1:8、1:10、1:12、1:14),提取次数(1、2、3次),提取时间(1、1.5、2、2.5、3 h)等条件对实验结果的影响。取各药材适量,精密称定,按实验设计,加入不同倍数的水,浸泡1 h后,加热提取,冷却去渣,提取液滤过后,定容至适当体积,采用收膏率和总酚酸含量作为对单因素试验设计结果的考察指标。

2.3.1 料液比对提取结果的影响 料液比实验结果表明,随着加水量的增加,收膏率和总酚酸提取率也随着增加,见图2。

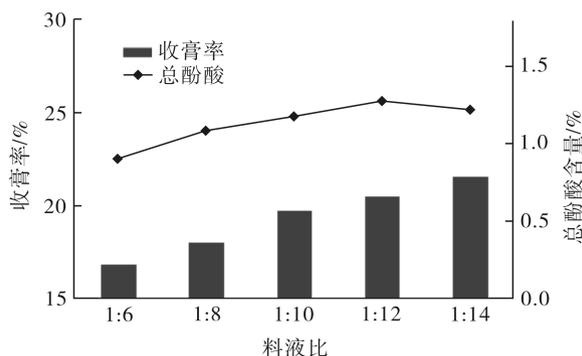


图2 料液比对结果的影响

2.3.2 提取时间对提取结果的影响 不同提取时间实验结果表明:随着提取时间的增加,收膏率和总酚酸提取率先增加,后随着提取时间增加而减少,在1.5 h时达到最大,见图3。

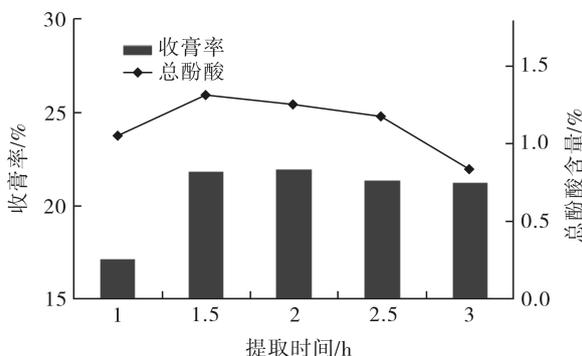


图3 提取时间对结果的影响

2.3.3 提取次数对提取结果的影响 不同提取次数实验结果表明:提取次数增加,总酚酸含量也随着增加,后随着提取次数继续增加含量变化不大;收膏率随着提取次数的增加而增大,见图4。

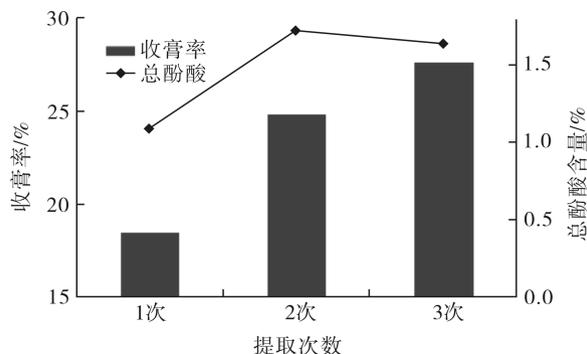


图4 提取次数对结果的影响

2.4 正交实验设计 参考文献[5],根据单因素预实验结果,选择煎煮料液比、煎煮次数、煎煮时间作为考察因素,每个因素选择三个水平,进行三因素三水平正交实验 $L_9(3^4)$,以干燥品计算收膏率和总酚酸含量,采用收膏率和总酚酸含量作为提取工艺评价的指标。正交实验因素水平见表1。

表1 正交实验因素水平表

水平	因素		
	A 提取次数	B 时间/h	C 料液比
1	1	1	1:8
2	2	2	1:12
3	3	3	1:14

2.5 最佳工艺确定 以综合评分法对实验结果进行直观分析和方差分析,综合评分 = 总酚酸含量评分 + 收膏率含量评分;总酚酸含量评分 = (总酚酸含量/最大总酚酸含量) × 0.6;收膏率评分 = (收膏率/最大收膏率) × 0.4。结果见表2和表3。用Excel和正交设计助手II v3.1分析表明,提取次数对实验结果影响差异有统计学意义($P < 0.05$),而提取时间和料液比影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。从表2中R值可知各因素对结果的影响高低程度为提取次数 > 料液比 > 提取时间。

方差分析显示,提取次数是本次实验的主要因素,考虑到酚酸成分受热时间过长,提取次数过多,会导致部分总酚酸的损失^[6],且增加能源成本,结合传统煎药方法,将提取次数定为2次。料液比是影响实验结果的重要因素之一,考虑到料液比在1:12和1:14间差异无统计学意义,从整体考虑,将料液比定为1:12。因提取时间对结果影响不显著,选择时间为1 h,根据以上实验结果,选择较佳工艺为 $A_2B_1C_2$ 。

表2 盆腔炎灌肠合剂的提取实验

编号	因素 A	因素 B	因素 C	收膏率/ %	总酚酸含 量/%	综合评 分/分
1	1	1	1	13.25	0.464 7	0.670 8
2	1	2	2	13.69	0.476 6	0.689 9
3	1	3	3	15.28	0.661 8	0.887 0
4	2	1	2	16.99	0.574 4	0.840 8
5	2	2	3	21.04	0.434 7	0.860 0
6	2	3	1	16.90	0.584 2	0.847 9
7	3	1	3	20.63	0.665 7	0.992 2
8	3	2	1	17.53	0.579 5	0.855 7
9	3	3	2	20.49	0.617 2	0.945 8
均值 1	0.749	0.835	0.791			
均值 2	0.850	0.802	0.825			
均值 3	0.931	0.894	0.913			
极差	0.182	0.092	0.122			

表3 正交实验方差结果分析

方差来源	离均差平方和	自由度 <i>n</i>	<i>F</i>	<i>F</i> 临界值	<i>P</i> 值
次数 A	0.050	2	25.00 ^a	19	<0.05
时间 B	0.013	2	6.50		>0.05
料液比 C	0.024	2	12.00		>0.05
误差	0.002	2			

注:^a*P* < 0.05 表明此因素对提取工艺结果影响显著。

3 讨论

酚酸成分广泛存在于药用植物中,比如丹参中的丹酚酸、金银花中的绿原酸和异绿原酸、当归中的阿魏酸等。酚酸类成分有抗菌^[7]、清除自由基、抗炎^[8]、抗肿瘤^[9]、免疫调节等多种药理活性。由相关文献[10-11]知,试验中使用的药材桃仁、红花、当归、川芎、蒲公英等亦含酚酸类物质,如绿原酸、阿魏酸、咖啡酸、香荚兰酸等,故选总酚酸为测定指标之一。

绿原酸是盆腔炎灌肠合剂中野菊花、蒲公英^[12]、紫花地丁^[13]、黄柏^[14]、红花^[10]等中药共同含有的一种酚酸类活性成分,可用紫外分光光度法、高效液相色谱法等多种方法检测,研究者^[15]以绿原酸为对照,建立了抗菌消炎片、抗感冒冲剂等成药

中总酚酸的含量分析方法,完善了中药的质量标准。盆腔炎灌肠合剂药物达 10 味,成份构成复杂且含量较低,其临床疗效体现在复方配伍的综合作用和整体效应上,故选择收膏率、总酚酸含量两个指标进行综合选取提取工艺。本试验以绿原酸做参照,测定了盆腔炎灌肠合剂中总酚酸的含量,结果表明,方法可行,稳定。

临床采用中药灌肠治疗盆腔炎的报道很多,本方是医院多年经验处方,临床效果确切,副作用轻微,并被广大患者接受,本方欲开发成一种符合医院制剂的中药灌肠剂,更适合临床推广。

参考文献

- [1] 高丽虹. 31879 名已婚女性妇科体检结果[J]. 浙江预防医学, 2013, 25(1): 70-71.
- [2] 吴晓锋, 海燕. 盆腔炎性疾病与女性不孕不育的相关性分析[J]. 河北医学, 2012, 18(6): 822-824.
- [3] 郭巧生, 房海灵, 申海进. 不同产地野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(9): 1160-1163.
- [4] 吴琴, 陈珣. 单因素实验结合响应面法优化朱砂根总皂苷的提取工艺[J]. 医药导报, 2014, 33(8): 1080-1082.
- [5] 余辉, 张咏梅, 陈晓峰, 等. 正交试验法优选垂盆草颗粒的水提工艺[J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(6): 42-45.
- [6] 卢玲巧, 周永传, 陈贤, 等. 丹参总酚酸动态循环提取工艺的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 2976-2979.
- [7] 屈景年, 莫运春, 刘梦琴, 等. 金银花中绿原酸一步提取法及绿原酸抗菌活性[J]. 化学世界, 2005, 46(3): 167-169.
- [8] 黄双盛, 吴勇杰. 丹参的抗氧化与抗炎作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(1): 86-87.
- [9] WANG JM, SHENG YC, JI LL, et al. Ferulic acid prevents liver injury and increases the anti-tumor effect of diosbulbin B in vivo[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2014, 15(6): 540-547.
- [10] 曾春萍. HPLC 法同时测定桃仁-红花对药中酚类物质含量[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(6): 56-57, 61.
- [11] 严贵亮, 段建荣. HPLC 法测定川芎-当归药对中酚酸类成分的含量[J]. 中国药师, 2015, 18(10): 1718-1720.
- [12] 汤启勋, 李雁玲, 喻振兴. 银射合剂的定性定量方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(10): 1623-1626.
- [13] 王丽萍, 徐传远, 田亚红, 等. 搅拌法提取紫花地丁中绿原酸的工艺[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(19): 4798-4800, 4804.
- [14] 廉莲, 万国盛, 贾伟利, 等. HPLC 同时测定黄柏中 6 种化学成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 94-97.
- [15] 张雷. 抗感冒冲剂质量标准研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(4): 231-232.

(收稿日期: 2016-11-13, 修回日期: 2016-12-05)