

正交试验优化复方三草滴丸制备工艺

何丽君¹, 徐小妹², 鄢英慧¹, 陈豪¹, 秦笑笑¹, 程心玲¹, 徐榕青² (1.福建中医药大学附属人民医院药学部, 福州 350004; 2.福建省医学科学研究院福建省医学测试重点实验室, 福州 350001)

摘要: 目的 优选复方三草滴丸制备工艺的最佳条件, 并测定滴丸中熊果酸的含量。方法 以滴丸的硬度、圆整度、拖尾度、黏连为评价指标, 采用正交试验设计方法优选滴丸制备工艺; 采用 HPLC 测定滴丸中熊果酸的含量。结果 滴丸的最佳制备工艺: 药物与基质配比为 1:2, PEG 4000 与 PEG 6000 的配比为 2:1, 适宜料温为 80 °C, 滴速为每分钟 40 滴; HPLC 测得滴丸中熊果酸的含量为 0.992 5 mg·g⁻¹。结论 复方三草滴丸制备工艺简便、可行, 得到的滴丸圆整度较高、色泽较亮、成形良好、质量可控。熊果酸含量测定方法稳定、可靠, 可用于滴丸的质量控制。

关键词: 复方三草滴丸; 正交试验; 熊果酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)09-1355-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.09.019

引用本文: 何丽君, 徐小妹, 鄢英慧, 等. 正交试验优化复方三草滴丸制备工艺[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(9): 1355-1359.

Optimization of Preparation Process of Compound Three Herbs Droplet by Orthogonal Experiment

HE Lijun¹, XU Xiaomei², YAN Yinghui¹, CHEN Hao¹, QIN Xiaoxiao¹, CHENG Xinling¹, XU Rongqing² (1.Department of Pharmacy, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China; 2.Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Measurement, Fujian Academy of Medical Sciences, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the condition of preparation technique of Compound Three Herbs droplet and determine the content of ursolic acid in the droplet. **METHODS** Taken the hardness, roundness, trailing degrees and stickiness of the droplets as the index for evaluation, orthogonal experiment was used to optimize preparation technique of the droplet. The content of ursolic acid in the droplet was determined by HPLC. **RESULTS** The optimal condition of preparation technique was as follows: ratio of drug to matrix was 1:2, ratio of PEG 4000 to PEG 6000 was 2:1, temperature of drug was 80 °C, infusion rate was 40 drops per minute. The content of ursolic acid measured by HPLC was 0.992 5 mg·g⁻¹. **CONCLUSION** The optimal preparation technique in Compound Three Herbs droplet is simple and feasible with good roundness of droplets, bright color, good forming and controllable quality. The method to determine the content of ursolic acid is stable and reliable, which can be used for quality control of droplets.

KEY WORDS: Compound Three Herbs droplet; orthogonal experiment; ursolic acid; HPLC

三草汤是福建中医药大学附属人民医院规定的协定处方, 由鬼针草、车前草、白茅根 3 味中药组成, 是蛇伤老中医黄守林独创的经验方, 对蛇伤引起的肾损害具有明显的保护作用。汤中君药鬼针草的主要活性成分为黄酮类化合物, 有明显的活血化瘀、清热解毒、通脉降压功能^[1]。三草汤有良好的清热解毒、消肿、散瘀功效, 可用来治疗疟疾、腹泻、跌打损伤、蛇虫咬伤等疾病^[2-4]。在国内外, 蛇伤的抢救和治疗公认用抗蛇毒血清, 但蛇伤多发生在农村, 抗蛇毒血清的普及和价格调整还面临许多问题。因此, 我国救治蛇伤仍以

中医、中药为主, 加强对治疗蛇伤的“三草汤”剂型研究具有很强的现实意义。

近年来随着固体分散技术的应用, 滴丸剂有了迅速的发展。滴丸是指液体或固体药物与基质加热融化混匀后, 滴入不相混溶的冷凝液中制成的丸剂^[5]。中药滴丸剂在临床应用上因其高效、速效的特点^[6-7], 常用于急症治疗。本实验采用固体分散技术将三草汤提取物制备成滴丸剂, 并对成型工艺进行考察, 同时对滴丸中的熊果酸含量进行测定, 旨在提高药物的工艺稳定性及质量可控性, 增加生物利用度, 方便患者携带和服用。

基金项目: 福建省科技计划项目(2014Y0060)

作者简介: 何丽君, 女, 硕士, 主任中药师

Tel: 13705087402

E-mail: helj0909@163.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

98-1-C 型数字控温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司); RE-2000B 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); LC-20A 半制备高效液相色谱仪(岛津香港有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); KQ3200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ABZ1-0501-P 艾科浦超纯水系统(重庆艾科浦); AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2 试剂

车前草(产地:江苏;批号:15031301)、鬼针草(产地:吉林;批号:15090502)、白茅根(产地:安徽;批号:150801)购自福建承创堂中药公司,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室主任杨成梓教授鉴定,分别为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L.的干燥全草、菊科(*Compositae*)管状花亚科鬼针草属(*Bidens* L.)的干燥全草及禾本科植物白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb.的干燥根茎;聚乙二醇 4000(PEG 4000,批号:DH228-1)、聚乙二醇 6000(PEG 6000,批号:DH229-1)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;液体石蜡(CP,西陇化工股份有限公司,批号:1511061);熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110742;供含量测定用,纯度 $\geq 98\%$)。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

按笔者所在医院规定的协定处方剂量比例称取鬼针草 60 g、车前草 30 g、白茅根 30 g,清洗混匀后将药材移入 2 000 mL 的圆底烧瓶中,精密量取 1 200 mL, pH 为 8 的 60%乙醇溶液于圆底烧瓶中浸泡药材 30 min,加热回流 1 h,趁热过滤。然后向滤渣中再次加入 1 200 mL 上述溶剂,加热回流 1 h,趁热过滤,合并滤液,减压浓缩至相对密度约 1.10~1.20(80 °C)的膏状物,经计算浸膏得率为 9.97%。

2.2 三草滴丸的制备及其工艺考察

2.2.1 基质的选择 为增加药物的溶解度,提高生物利用度,滴丸基质选用水溶性基质^[8]。目前用于中药滴丸的水溶性基质主要有聚乙二醇类(PEG)、聚氧乙烯 40、硬脂酸钠、甘油、明胶等。基质要求与主药不能发生反应,对人体无害,熔点比较低,易熔融,遇骤冷能很快凝固成固体,

且加入药物后这一性质不变。PEG 是滴丸中最常用的水溶性固态基质,因其熔点低,极易与药物熔融形成固体分散体,使药物更易溶解、熔融、滴制和成型。根据文献^[9],拟定辅料种类主要为 PEG 4000、PEG 6000 或者两者不同比例的混合物。经过预实验,PEG 4000 和 PEG 6000 的比例可在 1:1~2:1 之间选择,此范围配比有利于滴丸的成形及药物的溶出。

2.2.2 冷却剂的选择 滴丸制备时,常用的冷凝液有液体石蜡、二甲基硅油、植物油和水,冷凝液应根据基质的物理性质选择。水溶性基质一般会选用液体石蜡、二甲基硅油作为冷凝液。通过预实验,二者均可满足本制剂要求,考虑到液体石蜡较为经济,故选择液体石蜡作为冷却液。

2.2.3 药物与基质配比的筛选 药物与基质配比会直接影响滴丸的成型。将三草干浸膏与上述拟定的基质按不同的配比混合制成滴丸。以滴丸的硬度、圆整度、拖尾、黏连等直观因素为考察指标,采用 5 分评分制^[10](硬度由软到硬得分依次为 1~5 分,圆整度由不圆整到圆整得分为 1~5 分,拖尾由拖尾到不拖尾得分为 1~5 分,黏连由黏连到不黏连得分为 1~5 分)。结果显示药物与基质较适宜的配比范围为 1:1~1:3,见表 1。

表 1 药物与基质配比的初选结果

Tab. 1 Primary results for the ratio of drugs to the matrix

药物:基质	硬度	圆整度	拖尾	黏连	最终得分
2:1	4	2	2	3	11
1:1	3.5	3	3	3.5	13
1:2	3.2	4.5	4	4.2	15.9
1:3	2	3.5	3	4	12.5

2.2.4 料温与滴速的选择 料温与滴速是影响滴丸成型的重要因素,若料温偏低,会导致滴丸不宜滴制、流动性变差;料温偏高,则滴制过程不易控制。滴速过慢,滴丸易拖尾;滴速过快,容易造成滴丸最后的黏连。综合考虑滴丸硬度、圆整度、拖尾、黏连等外观质量评价指标,设计实验,结果见表 2~3。经过预实验,滴速的选择范围为每分钟 40~60 滴,料温的选择范围为 60~80 °C,滴丸具有较好的硬度、圆整度和冷凝性。

2.3 正交试验设计

根据上述实验,选用 $L_9(3^4)$ 正交表,以 PEG 4000 与 PEG 6000 的比例、药物与基质的比例、料温、滴速为 4 个因素,用正交试验对滴丸

的制备工艺进行优选。

评分标准：以滴丸的硬度、圆整度、拖尾、黏连等外观质量为评价指标，采用“2.2.3”项下的5分评分制，结果见表3，正交试验方差分析结果见表4。

表2 复方三草滴丸成型工艺因素水平表

Tab. 2 Table of factor level of compound Three Herbs droplet molding process

水平	因素			
	A (PEG 4000 : PEG 6000)	B (药物 : 基质)	C (料温/°C)	D 滴速/(滴/分钟)
1	1 : 1	1 : 1	60	40
2	2 : 1	1 : 2	70	50
3	1 : 2	1 : 3	80	60

表3 正交试验结果

Tab. 3 The result of orthogonal test

实验	因素				外观质量及评分				
	A	B	C	D	硬度	圆整	拖尾	黏连	得分
1	1	1	1	1	3.5	3	3.5	3.5	13.5
2	1	2	2	2	3	3.2	4	4	14.2
3	1	3	3	3	3	3.5	3	3	12.5
4	2	1	2	3	4.2	3.5	3.5	2	13.2
5	2	2	3	1	4	4.5	4	4.5	17
6	2	3	1	2	3	4	3	3	13
7	3	1	3	2	3.5	4	4	3.5	15
8	3	2	1	3	3	2	4	2	11
9	3	3	2	1	3.2	4.5	3	3.5	14.2
X_1	13.4	13.9	12.5	14.9					
X_2	14.4	14.067	13.867	14.067					
X_3	13.4	13.233	14.833	12.233					
X_1^2	179.56	193.21	156.25	222.01					
X_2^2	207.36	197.88	192.29	197.88					
X_3^2	179.56	175.11	220.02	149.65					
R	1.000	0.834	2.333	2.667					

表4 正交试验方差分析表

Tab. 4 Variance analysis table of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	0.226 7	2	1.259 4	4.460	$P > 0.05$
B(误差)	0.133 3	2	0.740 6	4.460	-
C	0.92	2	5.111 1	4.460	$P < 0.05$
D	1.246 7	2	6.926 1	4.460	$P < 0.05$

注： $F_{0.05}(2,8)=4.46$ ； $F_{0.01}(2,8)=8.65$ 。

Note： $F_{0.05}(2,8)=4.46$ ； $F_{0.01}(2,8)=8.65$ 。

由正交试验分析和方差直观分析的结果可得，各个因素对滴丸制备工艺的重要性依次为

$D > C > A > B$ ，其中D和C因素有显著性差异。选择R值最小的B项作为误差的近似估计。最佳组合为 $A_2B_2C_3D_1$ ，即滴丸成型的最佳工艺为PEG 4000与PEG 6000的比例为2:1，药物与基质的比例为1:2，适宜料温为80℃，滴速为每分钟40滴。用最佳的生产工艺，重复滴制3批滴丸进行评价，经验证，用正交试验优选的该制备工艺稳定可行。

2.4 样品中熊果酸含量的测定

2.4.1 色谱条件 LC-20A型岛津双泵高效液相色谱仪，ODS-SP型色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)，流动相为乙腈-0.1%甲酸(65:35)；检测波长为208 nm，流速为1.0 mL·min⁻¹，柱温为常温，进样量：10 μL，保留时间约为18 min。

2.4.2 溶液的配制 ①对照品溶液的制备：精密称取熊果酸的对照品4 mg，置于25 mL的量瓶中，加甲醇定容，即得对照品溶液，浓度为160 μg·mL⁻¹。②供试品溶液的制备：研细自制复方三草滴丸，精密称取2 g样品，置于25 mL量瓶中，加甲醇稀释定容至刻度，密塞，称定质量，超声处理30 min(150 W, 40 kHz)后，取出，放冷。再次称定质量，用甲醇补足至之前所称的质量。摇匀，用微孔滤膜过滤，将初滤液弃去，取续滤液即得。阴性对照溶液的制备：取缺车前草药材制备的阴性滴丸2 g，置于25 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，密塞，称定质量，用超声处理30 min(150 W, 40 kHz)，取出，放冷。再称定质量，用甲醇补足质量。摇匀，滤过，取续滤液即得。

2.4.3 专属性试验 分别吸取上述制备好的3种溶液各10 μL进样，进行测定，色谱图见图1。结果显示，在供试品溶液色谱图中有与对照品保留时间相同的熊果酸吸收峰，阴性对照溶液色谱图中则无此吸收峰。说明本方法用来测定三草滴丸中的熊果酸专属性强，无阴性干扰。

2.4.4 线性关系的考察 精密称取熊果酸对照品适量，加甲醇制成每1 mL含160 μg的溶液。分别精密吸取熊果酸对照品溶液1, 3, 5, 7, 9 μL注入高效液相色谱仪，进行含量测定。以进样量浓度C为横坐标x，以峰面积值为纵坐标y进行作图，得其回归方程为 $y=4\ 420.3x+2\ 729.5$ ， $R^2=0.999\ 7$ 。实验结果表明，对照品在16~144 μg·mL⁻¹内进样量与峰面积具有良好的线性关系。

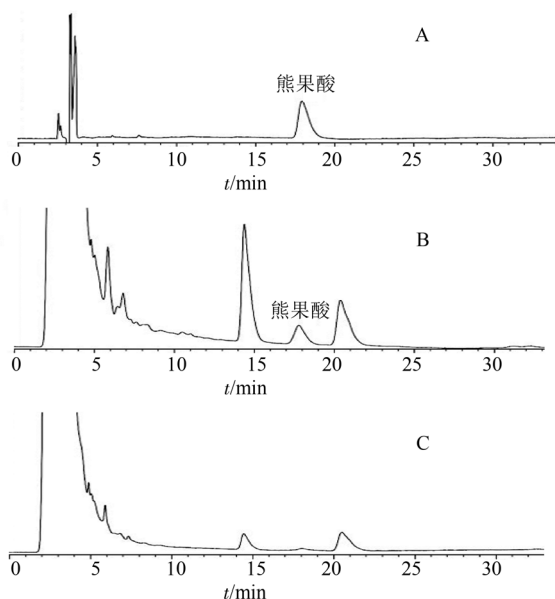


图1 含量测定色谱图

A-对照品; B-供试品; C-缺车前草药材阴性对照。

Fig. 1 Content determination chromatogram

A-control; B-sample; C-negative control of plantain herb.

2.4.5 仪器精密度试验 精密吸取熊果酸对照品溶液($160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $10 \mu\text{L}$ 进样,连续进样6次,测定峰面积,得RSD值为0.86%,表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 分别取放置4, 8, 12, 16, 24 h的供试品溶液,测定熊果酸的含量以考察其稳定性,得RSD值为1.47%,表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.4.7 重复性试验 取自制复方三草滴丸样品,制备6份供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件测定熊果酸的含量,结果显示熊果酸的平均含量为 $0.9925 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD=1.6%($n=6$),表明该法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 精密称取适量的熊果酸对照品,加入到已知含量的约1.0 g的滴丸样品中,制备成供试品溶液,进行熊果酸的含量测定,计算回收率。结果见表5,熊果酸平均加样回收率为99.98%, RSD值为1.58%。

2.4.9 样品的含量测定 精密称取自制的样品3批,按供试品溶液的制备方法进行制备,并按照上述高效液相色谱的条件进行含量测定,测得样品的含量分别为 $0.9925, 0.9927, 0.9924 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,平均值为 $0.9925 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD为1.6%。

表5 加样回收率实验结果

Tab. 5 The experimental results of sample recovery

序号	称样量/ g	样品量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
1	1.003 4	1.213	1.2	2.430 1	101.43		
2	1.002 0	1.084	1.2	2.269 3	98.78		
3	1.002 1	1.086	1.2	2.312 1	102.18		
4	1.010 3	1.228	1.2	2.423 1	99.59	99.98	1.58
5	1.004 8	1.059	1.2	2.257 4	99.87		
6	1.001 8	1.009	1.2	2.185 0	98.00		

3 分析与讨论

3.1 提取方法的确定

用UV法测定提取总黄酮的量,以乙醇浓度、料液比、pH值、提取时间为影响因素,进行三草汤提取工艺的正交实验。最终确定其最佳的提取工艺:用10倍量60%浓度的乙醇回流提取药材2次,每次提取1 h,提取pH为8^[11]。

3.2 滴丸基质的确定

滴丸所选基质通常需具备良好的化学惰性,既不与主药发生反应,又不影响主药的药效和检测,对人体无害并且熔点较低,在60~100℃条件下能融化成液体,遇冷又能立即凝成固体。符合此规定的一般大致有PEG 1000、PEG 1500、PEG 4000、PEG 6000。PEG 4000有利于滴丸的良好成形,但耐热性能和硬度较差,PEG 6000的硬度以及耐热性能较好,但不利于药物的溶出及滴丸最终的成形^[12],因此本试验选择二者按一定比例作为基质。

3.3 复方三草滴丸的含量测定

熊果酸与齐墩果酸是一对同分异构体,两者性质极为相近,采用常规的TLC法较难将二者分离,需试用多种流动相系统以便将其分离^[13]。含量测定时,为使目标峰与杂质峰分开,需试换流动相或者对流动相的比例不断进行调整。本实验曾试用过的流动相有甲醇-0.1%甲酸(88:12)、甲醇-0.1%甲酸(80:20)、乙腈-0.1%甲酸(64:36)等,最终确定采用乙腈-0.1%甲酸(65:35)作为流动相,可以使熊果酸峰与相邻峰达到良好的分离效果。对于滴丸中的指标成分熊果酸进行含量测定的方法有多种,如TLC、UV以及HPLC等。本试验采用HPLC对其进行测定,简便快速,准确灵敏,专属性强,重复性好。

3.4 滴丸制备过程中的注意事项

在滴丸的制备过程中,料温与滴速是影响滴丸成型的重要因素,若料温偏低,会导致滴丸不宜滴制、流动性变差;料温偏高,则滴制过程不易控制。滴速过慢,滴丸易拖尾;滴速过快,容易造成滴丸最后的黏连。在滴丸基质选择中,PEG类化合物的化学性质稳定,不与主药发生作用,对药物有助溶作用,且对人体无害,是较为理想的基质。药物与基质配比直接影响滴丸的成型^[14],既要满足中药滴丸力求增大药物的配比,以减少服用量的要求,又必须服从固体分散体中药物含量不能太高的规律,因固体分散体^[15]中药物所占比例过高,难于凝固固化成坚脆物。本实验中以滴丸的硬度、圆整度、拖尾、黏连等直观因素为考察指标,最终发现药物与基质配比在1:2具有良好的成型性和硬度。

4 结语

三草汤组方作为临床有效治疗蛇伤、热毒等病症的笔者所在医院协定处方,对其剂型的开发和研究极其重要并且很有意义。随着现代工作节奏和生活水平的提高,因汤剂水提液不利于携带、使用和贮藏,制成滴丸可以避免上述不足且更方便、安全使用。本实验制备的复方三草滴丸,丸形圆整,色泽均匀,质量可控;制备方法简便快速,检测方法灵敏可靠,可为复方三草滴丸的批量生产建立相应的质量标准,并提供一定的工艺基础。

REFERENCES

[1] HONG Q, HE D H, YUAN X, et al. Optimized preparation of molding process of total flavones of *Bidens Bipinnata* Dropping pills by central composite design-response surface

method [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(9): 996-1001.

- [2] LU X X. Research progress in antioxidant mechanism of flavonoids [J]. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2012, 33(3): 220-224.
- [3] WANG S J, HUANG X B, JIANG S, et al. Clinical study of anti-renal damage with Sancao decoction in snakebite patients [J]. *J Snake*(蛇志), 2010, 22(3): 206-207.
- [4] 杨旭, 黄小宾, 江山, 等. 蛇伤致急性肾功能衰竭87例的临床药物治疗[J]. *吉林医学*, 2012, 33(33): 7252.
- [5] 蔺海飞. 中药滴丸剂的研究进展[J]. *保健文汇*, 2016(1): 25.
- [6] YUAN J. Feature and application advance of Chinese Medicine Dropping pills [J]. *World Health Digest*(中外健康文摘), 2014(4): 39-40.
- [7] HE J L, HUANG S W. Quality standard and preliminary stability of toad skin sustained-release dropping pills [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2016, 33(5): 557-561.
- [8] 周凡, 马小琴, 郭小红, 等. 蔷薇红景天滴丸成型工艺研究[J]. *中国中医药科技*, 2016, 23(4): 437-440.
- [9] 严冬. 葛根素滴丸的制剂研究及评价[D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [10] LIU H, DENG L, WANG M, et al. Preparation and quality standard of Toothache Drop pills [J]. *Int J Trad Chin Med*(国际中医中药杂志), 2015, 37(8): 728-730.
- [11] HE L J, YAN Y H, JIANG J J, et al. Study on optimizing refluxing extraction for Sancaotang by orthogonal design method [J]. *Strait Pharm J*(海峡药学), 2010, 22(11): 61-63.
- [12] CHEN T Y, LIN X B, XU X P, et al. Study on preparation of Anti-asthma Dripping pills of Compound earthworm [J]. *Asia-Pac Trad Med*(亚太传统医药), 2016, 12(7): 34-36.
- [13] ZHU S T, ZHANG F L, JIN P, et al. Analysis of triterpenoids component in loquat leaf herbs and its preparations by HPLC [J]. *Her Med*(医药导报), 2017, 36(6): 673-676.
- [14] WANG Y F, HONG Q, ZHU S L, et al. Research of Tianning Dropping pills preparation by response surface methodology optimization model [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2014, 31(12): 1483-1487.
- [15] 王巍. 新基质复方丹参滴丸的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2004.

收稿日期: 2017-11-29

(本文责编: 李艳芳)