

· 药剂学 ·

# 正交设计优选黄桂灌肠剂的处方

邓丽琴, 张 岩 (无锡市妇幼保健院, 江苏 无锡 214002)

**[摘要]** 目的 优选黄桂灌肠剂处方。方法 采用正交试验设计法进行处方中各成分的用量筛选, 以小鼠廓清指数提高百分率和体外抑菌作用为考察指标, 确定黄桂灌肠剂的最佳处方并进行验证试验。结果 优选的黄桂灌肠剂的最佳处方为 1 000 ml 中含黄连 60 g 黄柏 180 g 桂枝 120 g 大黄 48 g 考察指标中, 小鼠廓清指数提高百分率 > 20%, 抑菌圈直径 > 35 mm, 结果达到要求。结论 优选的黄桂灌肠剂处方合理, 为临床应用提供了实验依据。

**[关键词]** 黄桂灌肠剂; 正交设计; 处方优选; 动物实验; 抑菌试验

**[中图分类号]** R 943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)03-0203-03

## Orthogonal design of formula optimization for Huanggui enema

DENG Liqin, ZHANG Yan (Wuxi Maternal and Child Health Hospital, Wuxi 214002, China)

**[Abstract]** **Objective** To choose the best formula for Huanggui enema. **Methods** The orthogonal test was used to optimize formula and the clearance index in mice and antibacterial action *in vitro* were observation index. The best formula was designed according to the result of this study. **Results** The formula is Rhizoma Coptidis 60 g, Cortex phellodendri 180 g, Ramulus Cinnamomi 120 g, Radix et Rhizoma Rhei 48 g per 1 000 ml. The clearance index in mice is greater 20%, diameter of inhibition zone is greater 35 mm. **Conclusion** The optimized formula is reasonable and provided an experimental basis for clinical application.

**[Key words]** Huanggui enema; orthogonal design; formula optimization; animal experiments; antibacterial test

我们根据盆腔炎的发病机制以及临床表现并结合多年的临床治疗经验, 以黄连、黄柏、桂枝、大黄等中药为主要成分, 研制了妇科用制剂黄桂灌肠剂, 临床主要用于治疗急慢性盆腔炎。为了选择最佳处方, 达到治疗效果恒定、不良反应小的目的, 本研究采用正交试验设计法并以对小鼠碳粒廓清的影响和体外抑菌试验, 对黄桂灌肠剂的处方进行优选试验。

### 1 材料

比色仪、700生化分析仪(美国 Beckman 公司); 黄桂灌肠剂(本院制剂室); 昆明种小鼠(♀, 体质量 18~22g 江南大学实验动物中心); 金黄色葡萄球菌(本院检验科), 培养基(中国药品生物制品检定所)。

### 2 方法与结果

**2.1 因素及水平** 根据预试验, 处方由黄连、黄柏、桂枝、大黄、尼泊金乙酯和纯化水组成, 试验时对剂

治疗作用的黄连、黄柏、桂枝、大黄 4 个因素安排 4 个水平, 具体数据见表 1。

表 1 黄桂灌肠剂处方因素水平表  
(1000 ml 灌肠剂中药物的克数)

水平	因素			
	黄连 (A)	黄柏 (B)	桂枝 (C)	大黄 (D)
1	40	140	80	32
2	50	160	100	40
3	60	180	120	48
4	70	200	140	56

为了减少试验误差, 对以上 4 个因素的水平进行随机化处理, 见表 2。

表 2 随机化后的黄桂灌肠剂处方因素水平表

水平	因素			
	A	B	C	D
1	40	140	140	32
2	70	160	100	56
3	50	200	120	40
4	60	180	80	48

**2.2 对小鼠碳粒廓清的影响<sup>[1,2]</sup>** 取健康昆明种小鼠 160 只随机分成 16 组, 每组 10 只, 分笼存放并编号, 其中 5 只作为每组的空白对照, 用纯化水灌肠

**[作者简介]** 邓丽琴(1964), 女, 学士, 主管药师. Tel (0510) 82725161, E-mail dlq6303@126.com  
**[通讯作者]** 张 岩. Tel (0510) 82725161, E-mail 2004zhangshanshi@163.com.

10 ml/kg qd 连用 7 d, 另 5 只按表 3 试验号中对应的处方药物用量制备的黄桂灌肠剂进行灌肠, 用量为 10 ml/kg qd 连用 7 d。末次给药 1h 后, 每鼠尾静脉注射印度墨汁 10 ml/kg 于 1.5 min 后分别经眼眶静脉取血 20 ml 加 0.1% 碳酸氢钠, 摇匀, 于 680 nm 下比色读取吸收度。最后将小鼠脱颈处死, 分别称取肝、脾质量。计算廓清指数以及廓清指数提高百分率。为便于计算, 结果均取 5 只小鼠的平均值。

2.3 体外抑菌作用

2.3.1 菌液制备<sup>[3]</sup> 取经 35℃ 培养 24 h 的金黄色葡萄球菌的肉汤新鲜培养物 1 ml 加入 9 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液中, 10 倍系列稀释至使菌数约为 100~200 cfu/ml 的菌液。取此菌液 1 ml 注入直径为 9 cm 的平皿中, 立即倾注营养琼脂培养基 25 ml 混匀并均匀摊布, 35℃ 培养 24 h 观察, 在整个碟底可见到金黄色、圆形凸起、边缘整齐的菌落生长。

2.3.2 抑菌试验 分别取表 3 试验号中对应的处方量制备的黄桂灌肠剂 5 ml 作供试液, 用直径 12 mm 消毒滤纸片分别浸入上述供试液中, 取出沥干后分别贴于菌碟中, 35℃ 恒温 24 h 观察抑菌圈情况, 每一处方共 5 只菌碟, 抑菌圈取 5 只菌碟平均数。

2.4 评价标准 对小鼠碳粒廓清的影响, 以小鼠廓清指数提高百分率 (%) = [(给药小鼠平均廓清指数 - 空白小鼠平均廓清指数) / 空白小鼠平均廓清指数] × 100% 为评价指标, 评价黄桂灌肠剂对免疫功能的促进作用, 以 Q<sub>1</sub> 表示, 优为 Q<sub>1</sub> ≥ 20%, 良为 20% > Q<sub>1</sub> ≥ 15%, 中为 15% > Q<sub>1</sub> ≥ 10%, 差为 < 10%。体外抑菌作用以抑菌圈的直径为评价指标, 以 Q<sub>2</sub> 表示, 优为 Q<sub>2</sub> ≥ 35 mm, 良为 35 mm > Q<sub>2</sub> ≥ 25 mm, 中为 25 mm > Q<sub>2</sub> ≥ 15 mm, 差为 Q<sub>2</sub> < 15 mm。

2.5 正交试验结果与分析 黄桂灌肠剂的处方筛选的正交试验结果见表 3, 对实验结果进行方差分析, 结果见表 4。

由表 3 直观分析结果可见, 各因素对小鼠廓清指数影响大小顺序为 C > A > B > D, 其最佳水平组合为 A<sub>4</sub>B<sub>4</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>。各因素对体外抑菌效果影响大小顺序为 A > B > C > D, 其最佳水平组合为 A<sub>4</sub>B<sub>4</sub>C<sub>3</sub>D<sub>4</sub>。两个指标的差异为 D 因素, 即大黄的用量。由表 4 方差分析结果可见, 当以小鼠廓清指数的提高百分率为评价指标时, 因素 A 和 C 对结果有极显著性差异 (P < 0.01), 因素 B 对结果有显著性差异 (P < 0.05); 因素 D 对结果无显著差异 (P >

0.05); 以体外抑菌效果为评价指标时, 仅因素 A 对结果有极显著性差异 (P < 0.01), 而因素 B、C、D 对结果均无显著差异 (P > 0.05)。综合直观分析和方差分析, 并依据临床用药经验, 最佳因素水平组合为 A<sub>4</sub>B<sub>4</sub>C<sub>3</sub>D<sub>4</sub>。

表 3 黄桂灌肠剂处方正交试验结果

编号	A	B	C	D	Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>
1	1	1	1	1	12.2	12.5
2	1	2	2	2	8.4	12.9
3	1	3	3	3	20.1	11.4
4	1	4	4	4	6.5	14.5
5	2	1	2	3	10.7	24.5
6	2	2	1	4	12.4	24.9
7	2	3	4	1	5.8	15.9
8	2	4	3	2	21.3	19.8
9	3	1	3	4	13.7	20.5
10	3	2	4	3	2.6	14.4
11	3	3	1	2	13.0	14.3
12	3	4	2	1	8.9	19.0
13	4	1	4	2	8.1	27.4
14	4	2	3	1	19.1	34.7
15	4	3	2	4	13.2	29.7
16	4	4	1	3	17.0	36.3
K <sub>1</sub>	11.8	11.2	13.7	11.5	193.0	332.7
K <sub>2</sub>	12.6	10.6	10.3	12.7		
K <sub>3</sub>	9.6	13.0	18.6	12.6		
K <sub>4</sub>	14.4	13.4	5.8	11.5		
R	4.8	2.8	12.8	1.2		
K <sub>1</sub>	12.8	21.2	22.0	20.5		
K <sub>2</sub>	21.3	21.7	21.5	18.6		
K <sub>3</sub>	17.1	17.8	21.6	21.7		
K <sub>4</sub>	32.0	22.4	18.1	22.4		
R	19.2	4.6	3.9	3.8		

表 4 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
免疫试验					
A	47.4	3	15.8	12.15	< 0.01
B	22.5	3	7.5	5.77	< 0.05
C	350.1	3	116.7	89.77	< 0.01
D	5.5	3	1.8	1.38	> 0.05
误差	4.0	3	1.3		
抑菌试验					
A	815.5	3	271.8	42.47	< 0.01
B	49.8	3	16.6	2.59	> 0.05
C	40.7	3	13.6	2.13	> 0.05
D	32.8	3	10.9	1.70	> 0.05
误差	19.1	3	6.4		

F<sub>0.05</sub>(3, 5) = 5.41, F<sub>0.01</sub>(3, 5) = 12.06

2.6 验证实验 按最佳处方制备 5 批黄桂灌肠剂进行验证实验, 结果小鼠廓清指数提高百分率为 21.3% ~ 23.6%, 体外抑菌圈直径为 37.6 mm ~ 39.2 mm, 两项指标均超过了预定评价标准的要求。

### 3 讨论

由试验结果和相关分析来看, A、B两因素均以第 4水平为最佳, C因素以第 3水平为最好, 在免疫试验中, D因素以 D<sub>2</sub>为最佳, 在体外抑菌试验中以 D<sub>4</sub>为最好, 直观分析中, 两种实验的 R值均最小, 方差分析中两种实验均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。无论取 D<sub>2</sub> 还是取 D<sub>4</sub> 都能满足试验要求, 因此结合临床实验并经综合考虑, 最佳水平组合为: A<sub>4</sub>B<sub>4</sub>C<sub>3</sub>D<sub>4</sub>。由试验结果和分析可知, 黄桂灌肠剂最佳处方为每 1 000 ml 中含黄连 60 g 黄柏 180 g 桂枝 120 g 大黄 48 g 各因素选出的最佳水平都处于试验方案的中间, 说明试验方案中各因素水平的确定是合适的。

盆腔炎是妇科常见病、难治病, 具有病程长、治愈率低、复发率高的特点。盆腔炎发病除与病原体感染有关外, 还与机体免疫功能低下或紊乱有关。中医认为: “正气存内, 邪不可干”, “邪之所凑, 其气必虚”<sup>[4,5]</sup>, 故机体的免疫状态对病原微生物引起的炎症过程有着重大影响。本实验结果表明, 黄桂灌肠剂能显著增加小鼠廓清指数的含量, 说明该药对免疫功能有良好的促进作用, 加之该药体外抑菌作

用较强, 从而进一步降低盆腔炎病人炎症反应的症状。

采用正交试验设计法优选黄桂灌肠剂的配方, 以小鼠廓清指数提高值和体外抑菌效果为评价指标, 采用统计学方法分析计算, 较好地筛选出黄桂灌肠剂的最佳处方, 方法可行, 收效满意, 为临床应用提供了实验依据。

### 【参考文献】

- [1] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1991: 157.
- [2] 姚文斌. 波叶大黄多糖对免疫功能作用 [J]. 中国药科大学学报, 1990, 21(2): 99.
- [3] 郭江江, 张春瑛. 咪唑类抗真菌乳膏微生物限度检查方法学验证 [J]. 中国药师, 2007, 10(6): 602.
- [4] 梁君儿. 对慢性盆腔炎湿热内结证候的探讨 [J]. 中国医药学报, 1995, 10(4): 6.
- [5] 贾丽娜, 赵世萍, 闫静, 等. 妇科千金软胶囊治疗盆腔炎药效学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 18.

[收稿日期] 2009-11-04  
[修回日期] 2010-01-22

(上接第 200 页)

结果表明两者的回收率都在 95% ~ 105% 之间, RSD 均小于 3%, 符合有关规定。

### 3 样品测定

取 3 批样品, 分别制备供试品溶液, 测定盐酸麻黄碱与盐酸伪麻黄碱的峰面积, 用外标法进行计算, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ( $n = 3$ )

批号	盐酸麻黄碱含量 (mg/ml)	盐酸伪麻黄碱含量 (mg/ml)
090501	0.142 2	0.126 8
090701	0.145 1	0.130 2
090901	0.110 3	0.101 4

### 4 讨论

**4.1 流动相的选择** 笔者曾采用 0.021 mol/L 磷酸二氢钾 (磷酸调 pH = 2.5) - 甲醇 (94: 6)<sup>[2]</sup>、0.2% 磷酸-乙腈 (96: 4) 为流动相进行试验, 前者分离效果和理论塔板数都达不到要求; 后者由于

酸性太强对柱子损伤较大, 基线经常不稳。后来采用了乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (pH = 2.7), (4: 100, 含 0.1% 三乙胺) 作为流动相, 2 种成分的色谱峰都比较理想, 分离度也大于 2.0 且性质较为稳定。

**4.2 样品的前处理** 曾用多种方法处理过样品, 如乙醇溶解法<sup>[3]</sup>和乙醚萃取法<sup>[4]</sup>, 经过测试后发现蒸馏法提取效果最好, 盐酸麻黄碱的含量最高, 且干扰的杂质峰少。

### 【参考文献】

- [1] 成红娟, 曲婷丽, 刘锐玲, 等. HPLC 同时测定止咳立效口服液 中盐酸麻黄碱与盐酸伪麻黄碱含量 [J]. 中成药, 2009, 2: 240.
- [2] 李小娜, 孙志明. HPLC 测定止咳平喘口服液 中盐酸麻黄碱含量 [J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 307.
- [3] 王建波, 秦雅英, 张志勇. HPLC 法测定抗感 121 服液中麻黄碱含量 [J]. 黑龙江医药, 2004, 17: 401.
- [4] 上海市食品药品监督管理局医疗机构制剂质量标准 [S]. SYZ-ZF-113-2005.

[收稿日期] 2009-12-28  
[修回日期] 2010-03-09