

复方参蛇洗剂的研制和评价

李 晏 (解放军第 411 医院, 上海 200081)

[摘要] **目的** 研究复方参蛇洗剂的制备方法。**方法** 采用正交设计法优化复方参蛇洗剂的制备方法,建立了制剂的质量评价方法,观察复方参蛇洗剂的抗炎、抑菌、止痒等与药效学相关的药理作用。**结果** 研制的复方参蛇洗剂工艺稳定,质量可靠,具有明显的抗炎、抑菌、止痒作用。**结论** 研制的复方参蛇洗剂具有一定的临床应用前景。

[关键词] 复方;苦参;蛇床子;洗剂

[中图分类号] R286 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0372-04

Preparation and evaluation of compound Shenshe lotion

LI Yan (NO. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China)

[Abstract] **Objective** To study the preparation method of compound Shenshe lotion. **Methods** The preparation method was optimized by orthogonal design and the determination method was constructed. The pharmacological effects of compound Shenshe lotion including the anti-inflammation, bacteriostasis and anti-pruritus were studied. **Results** The preparation and quality control methods were stable and reliable. The compound Shenshe lotion had apparent effects of anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-pruritic. **Conclusions** The compound Shenshe lotion was feasible for the clinical application.

[Key words] compound; Lightyellow Sophora Root; Fructus Cnidii; lotion

复方参蛇洗剂来源于民间验方(含苦参、蛇床子、黄柏等 15 味中国药典^[1]收载中药),具有祛风杀虫、消炎止痒的功效,临床用于急性湿疹、疥疮、手足癣、皮炎等引起的皮肤瘙痒症。为提高该制剂质量,保证患者用药的安全有效,笔者对该制剂制备工艺、质量标准和药效学进行了研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器 BS124S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);高效液相色谱仪(美国 WATERS 公司,515 HPLC 泵,Rheodyne7725i 定量进样器,996 photodiode array 检测器,millennium 32 色谱数据工作站);DK-S12 型电热恒温水浴锅(上海华联医疗器材有限公司);PB-10 型 pH 计(Sartorius pH 计),SK-1200H 型超声处理器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 材料 复方参蛇洗剂(自制,批号为 000001,000002,000003);苦参碱对照品(中国药品生物制品检定所)。洁尔阴洗液(成都恩威制药有限公司,批号 091205);二甲苯(上海化学试剂商店);注射用青霉素 G 钾(上海新先锋药业有限公司,批号 090502);硫酸链霉素(上海嘉辰化工有限公司,批

号 090609);磷酸组织胺(中国药品生物制品检定所,批号 510910,规格 25 mg/支)。

1.3 动物与菌种 动物:昆明种小白鼠 50 只,雌雄兼用,体重 18~22 g;Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 120~180 g。豚鼠 50 只,雌雄兼用,体重 260~400 g。以上动物均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。菌种:致病性大肠杆菌(26001)、伤寒沙门氏菌(88087)、福氏志贺氏菌 2a(51536)、金黄色葡萄球菌(26001)、绿脓杆菌(10104)、乙型溶血性链球菌(32172)、肺炎双球菌(31002),均购自上海市药检所,均为标准菌株。

培养基:营养琼脂(上海市医学化验所试剂厂);10%羊血琼脂(以营养琼脂为营养培养基加入新鲜的脱纤维羊血至 10%浓度);营养肉汤和 10%小牛血清肉汤(自制)。

2 方法与结果

2.1 复方参蛇洗剂的水煮醇沉工艺的优化 本研究选定煎煮时间、醇沉浓度作为考察因素,每个因素各设三个水平进行正交设计试验,以优选苦参等提取工艺。提取物提取率的测定:分别量取 1~9 号实验各浸提液适量(相当于生药 2 g)置蒸发皿中水浴蒸干后,60℃减压干燥至恒重,取出,放置干燥器中冷却 30 min,精密称定,除去蒸发皿的重量,计算提取物提取率。结果见表 1。

表1 苦参等提取后的苦参碱正交试验表

试验序号	A(首次煎煮时间 h)	B(二次煎煮时间 h)	C(三次煎煮时间 h)	D(醇沉浓度%)	提取物得率(%)
1	0.5	0.5	0.5	50	4.12
2	0.5	1	1	60	6.38
3	0.5	2	2	70	8.03
4	1	0.5	1	70	8.59
5	1	1	2	50	4.61
6	1	2	0.5	60	7.05
7	2	0.5	2	60	8.97
8	2	1	0.5	70	9.58
9	2	2	1	50	7.15
K1	6.18	7.23	6.92	5.29	
K2	6.75	6.86	7.37	7.47	
K3	8.57	7.41	7.20	8.73	
R	2.39	0.55	0.46	3.44	

极差分析结果 $D > A > B > C$, 优选 D3A3B3C2。从节能和省时方面考虑, B选2水平, C选1水平为好。因此, 合理提取工艺条件为 D3A3B2C1。即煎煮的时间依次为2, 1, 0.5 h, 合并3次煎液, 过滤, 滤液浓缩至密度为1.05~1.08(60~65℃), 冷却至室温时, 搅拌并缓慢加入乙醇, 使乙醇量达70%, 静置15min, 过滤取清液, 回收乙醇, 浓缩得浓缩液备用。

2.2 复方参蛇洗剂的制备工艺 取苦参、蛇床子、黄柏等15味中药, 加入水超过药面, 共煎煮3次。在煎煮过程中, 随时补充蒸发失去的水分, 蒸煎的时间依次为2, 1, 0.5 h, 合并三次煎液, 滤过滤液, 浓缩至相对密度为1.05~1.08(60~65℃), 冷却至室温时, 搅拌并缓慢加入乙醇, 使乙醇量达70%, 静置15min, 滤取清液, 回收乙醇, 浓缩得浓缩液, 使成为1:10(即1ml浓缩液相当于10g药材), 相对密度为1.18~1.22(80~85℃), 加入基质、去离子水搅拌均匀, 灌装成瓶, 热合包装, 印字成品, 按方量制成洗剂, 每瓶量200ml。

2.3 pH、装量和微生物检查

2.3.1 pH值 取本品1ml, 加10倍的水稀释成溶液, 依法测定(《中国药典》2010年版一部附录VII G), 3个批号的样品的pH测定结果符合pH为6.0~7.0的标准。

2.3.2 装量 取本品3瓶, 将内容物分别倾入经校正的干燥量筒中, 黏稠液体倾出后, 将容器倒置15min, 倾净。读出每个容器内容物的装量, 并求出平均装量。经试验, 3批样品的装量均不少于平均装量的95%, 符合规定。

2.3.3 微生物限度 取本品, 按照微生物限度检查法(中国药典2010年版一部附录VIII C)的规定进行检查, 3个批号的样品测定结果均符合规定。

2.4 含量测定 以高效液相色谱法^[2,3]测定制剂中苦参碱的含量。

2.4.1 色谱条件 仪器 美国WATERS公司, 515 HPLC泵, Rheodyne7725i 定量进样器, 996 photodiode array 检测器, millennium 32 色谱数据工作站。色谱柱: Kromsail C₁₈柱; 流动相: 乙腈-0.02 三乙胺溶液(30:70); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 220 nm。

测定法: 对照品溶液的制备, 精密称取苦参碱对照品适量, 加甲醇制成每1ml中约含1mg的对照品溶液, 作为对照品储备液。精密量取对照品储备液0.1ml, 置5ml量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得。供试品溶液的制备, 精密量取装量差异检查项下的本品5ml, 加水5ml超声溶解, 蒸干, 残渣用甲醇5ml溶解, 超声, 离心, 取上清液过滤, 即得。分别取对照品溶液和供试品溶液各10μl, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算, 即得。

2.4.2 方法学考察

2.4.2.1 线性关系 取苦参碱对照品储备液0.1、0.2、0.4、0.8、1.2ml, 置10ml量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 配制成浓度为10.06、20.12、40.24、80.48、120.72 μg/ml的溶液, 作为苦参碱对照品溶液。分别取10μl注入液相色谱仪, 记录峰面积。X为苦参碱对照品的浓度, Y为峰面积。Y=0.5897X-0.6956, r=0.9999; 结果表明苦参碱在10.06~120.72 μg/ml范围内浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.2.2 精密度 分别取浓度为20.12、40.24、80.48 μg/ml的苦参碱对照品溶液, 照上述色谱条件, 连续进样5次, 计算相对标准偏差, 考查日内精密度。取浓度为20.12 μg/ml的苦参碱对照品溶液, 照上述色谱条件, 连续3天, 每天进样3次, 计算相对标准偏差, 考查日间精密度。日内精密度和日间精密度RSD分别为0.62%和1.05%, 符合测定要求。

2.4.2.3 稳定性 精密吸取上述制备的供试品溶

液,照上述色谱条件,每隔 2 h 进样一次,共进样 5 次,计算相对标准偏差, *RSD* 为 1.23%,符合测定要求。

2.4.2.4 加样回收率 精密量取已测知含量的复方参蛇洗剂(批号 000001) 2.5 ml,按 80%、100% 和 120% 的比例,精密加入苦参碱对照品适量,分别称取 3 份,共 9 份,按含量测定项下的条件和方法测定,计算回收率,平均回收率为(96.25 ± 0.79)%。从回收试验结果可以看出,方法的准确度较好。

2.4.2.5 样品测定 以上述方法测定 3 批样品,结果每 100 ml 样品中的苦参碱含量分别为(11.2 ± 1.1) mg;(11.6 ± 0.8) mg;(10.8 ± 0.5) mg。结果得 3 批样品每 100 ml 中含苦参碱的量都不少于 10 mg。

2.5 抗炎作用评价

2.5.1 小鼠耳廓二甲苯致炎试验 动物随机分为 5 组,每组 10 只。对照组;洁尔阴组(10% v/v, 0.05 ml/20 g);复方参蛇洗剂 3 个剂量组(5%、10%、20% v/v, 0.05 ml/20 g)。试验当日各组涂药一次,对照组涂以相同量蒸馏水 0.05 ml/20 g。1 h 后各给药组以蒸馏水洗去药液,用干棉球擦净。给小鼠右耳涂以二甲苯 0.05 ml/只,左耳作对照,15 min 后处死动物,用直径 6 mm 的打孔器将双耳同部位等面积切下,分析天平称重,以左耳、右耳片重量之差

为肿胀程度。计算各组肿胀度,求出肿胀抑制率(%),结果见表 2。复方参蛇洗剂有明显抑制小鼠耳廓肿胀的作用,洁尔阴亦有同样的作用。

表 2 复方参蛇洗剂对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的影响

组别	剂量	动物数(只)	肿胀度(mg)	抑制率(%)	<i>P</i>
对照组		10	17.4 ± 3.9		
洁尔阴组	10%	10	5.6 ± 2.6	67.8	<0.01
复方参蛇洗剂组	5%	10	13.1 ± 4.5	24.7	<0.05
复方参蛇洗剂组	10%	10	10.6 ± 3.1	39.1	<0.01
复方参蛇洗剂组	20%	10	8.6 ± 3.5	50.6	<0.01

2.5.2 大鼠蛋清足跖肿胀试验 将大鼠 60 只随机分 6 组,① 对照组;② 洁尔阴组(成品的 10%, 0.1 ml/100 g);③~⑤ 复方参蛇洗剂大、中、小剂量组(成品的 20%, 10%, 5% v/v 0.1 ml/100 g);⑥ 复方参蛇洗剂基质组(10% v/v, 0.1 ml/100 g)。实验前按毛细管放大测量法测定各组大鼠右后足的正常体积(ml),实验当日各给药组涂药 1 h 后,各组右后足跖皮下注射 100% 新鲜蛋清 0.05 ml/只,同时再涂药一次,对照组涂以等量蒸馏水 0.1 ml/100 g。测定致炎后 1、2、4、6 h 的右后足体积。各大鼠致炎前后足体积的差值为肿胀度,比较各组肿胀度的差异。

表 3 复方参蛇洗剂对大鼠蛋清性足跖肿的影响

组别	剂量	动物数(只)	致炎前足跖体积	致炎后不同时间足跖肿胀度(ml)			
				1 h	2 h	4 h	6 h
对照组		10	1.03 ± 0.06	0.50 ± 0.12	0.51 ± 0.08	0.46 ± 0.07	0.42 ± 0.07
基质组	10%	10	1.08 ± 0.06	0.45 ± 0.08	0.45 ± 0.12	0.41 ± 0.16	0.40 ± 0.17
洁尔阴组	10%	10	1.02 ± 0.06	0.29 ± 0.09 ¹	0.31 ± 0.11 ²⁾	0.30 ± 0.11 ²⁾	0.29 ± 0.08 ²⁾
复方参蛇洗剂	5%	10	1.11 ± 0.06	0.42 ± 0.09	0.44 ± 0.11	0.42 ± 0.07	0.34 ± 0.04 ²⁾
复方参蛇洗剂	10%	10	1.10 ± 0.03	0.33 ± 0.10 ²⁾	0.39 ± 0.05 ²⁾	0.34 ± 0.10 ²⁾	0.23 ± 0.06 ²⁾
复方参蛇洗剂	20%	10	0.99 ± 0.08	0.30 ± 0.08 ²⁾	0.36 ± 0.09 ²⁾	0.30 ± 0.07 ²⁾	0.26 ± 0.07 ²⁾

注: ¹⁾ *P* < 0.01; ²⁾ *P* < 0.05, 与对照组比较

由表 3 可见,复方参蛇洗剂大、中、小 3 个剂量组随着剂量增大其抑制大鼠足跖肿胀的作用加强。中剂量组致炎后 2、4 h,大剂量组致炎后 1~4 h 与对照组比较皆有显著性差异。阳性药洁尔阴亦有抑制炎症的作用。复方参蛇洗剂基质组无抗炎作用。结果表明,复方参蛇洗剂有明显的抗炎作用,而基质无抗炎作用。洁尔阴亦有抗炎作用。

2.6 抑菌作用评价 取灭菌小试管若干支,用相应的培养基稀释被试药,其最终浓度分别为 0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5、0.006 25 及 0.003 125 g/ml,每管装 1 ml。每管加入 0.1 ml 稀释的新鲜菌液,置 37 °C 培养箱内培养 18 h 后观察有无细菌生长,如果药物颜色深或不透明,无法判定有无细菌生长时,把可疑的管再移到平皿培养基上,培养 18 h 后观察

有无细菌生长。细菌不生长的最高药物稀释度为该药的最低抑菌浓度。

结果表明:由表 4 可见,复方参蛇洗剂是无菌的,置 37 °C 培养 18 h 没有细菌生长。复方参蛇洗剂对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、肺炎双球菌、伤寒沙门氏菌、致病性大肠杆菌、福氏志贺氏菌等均有不同程度的抑菌作用。对绿脓杆菌无抑制作用。

2.7 止痒作用评价 将豚鼠随机分为 5 组,每组 10 只。① 对照组;② 洁尔阴组(10%, 0.1 ml/100 g);③ 复方参蛇洗剂大剂量组(20% v/v, 0.1 ml/100 g);④ 复方参蛇洗剂中剂量组(10% v/v, 0.1 ml/100 g);⑤ 复方参蛇洗剂小剂量组(5% v/v, 0.1 ml/100 g)。

试验前一日,给各组豚鼠右后足背剃毛,涂药一

次。试验当日,用粗砂纸擦伤右后足背剃毛处,面积1平方厘米,局部再涂药一次,对照组给予等量蒸馏水。末次涂药后10 min,开始在创面处滴0.01%磷

酸组织胺0.05 ml/只。直至出现豚鼠回头舔右后足,以最后出现豚鼠回头舔右后足时所给予的磷酸组织胺总量为致痒阈。记录并比较各组的致痒阈。

表4 复方参蛇洗剂抑菌试验结果(液体试管法)

菌体	复方参蛇洗剂浓度(g/ml)							药物对照	菌株对照
	0.2	0.1	0.05	0.025	0.012 5	0.006 2	0.003 1		
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	-	+
肺炎双球菌	-	-	+	+	+	+	+	-	+
乙型溶血性链球菌	-	-	-	-	+	+	+	-	+
福氏志贺氏菌	-	-	-	-	+	+	+	-	+
致病性大肠杆菌	-	-	-	+	+	+	+	-	+
伤寒沙门氏菌	-	-	-	-	+	+	+	-	+
绿脓杆菌	+	+	+	+	+	+	+	-	+

表5 复方参蛇洗剂对磷酸组织胺致痒反应的影响

组别	剂量	动物数	致痒阈(磷酸组织胺总量 μg)	P
对照组		10	35.68 ± 20.1	
洁尔阴组	10%	10	625.6 ± 26.3	<0.01
复方参蛇洗剂组	5%	10	47.9 ± 32.6	
复方参蛇洗剂组	10%	10	325.6 ± 32.1	<0.05
复方参蛇洗剂组	20%	10	526.6 ± 36.2	<0.01

由表5可见,复方参蛇洗剂大剂量组有明显提高豚鼠致痒阈的作用,与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$);中剂量组亦有较显著的提高致痒阈的作用($P < 0.05$)。洁尔阴组致痒阈与对照组相比有极显著的差异($P < 0.01$)。

3 讨论

复方参蛇洗剂以苦参、蛇床子、黄柏等为主要药物,其中苦参清热燥湿、解毒杀虫、祛风止痒为君药;黄柏清热燥湿、泻火解毒,蛇床子祛风燥湿、杀虫止痒共为臣药,以协助苦参的作用。苦参主要有效成分是苦参碱和氧化苦参碱,具有良好的调节免疫和

抗过敏作用^[4]。

通过本研究,制备工艺中中药成分的提取方案得到了优化,其质量标准针对方中主药采用了专属性较强的HPLC测定法,提高后的检查项较以前更为合理。药效学研究印证了复方参蛇洗剂在临床上杀菌、消炎和止痒的功效。制剂制备工艺、质量标准和药效学研究结果表明研制的复方参蛇洗剂具有一定的临床应用前景。

【参考文献】

- [1] 中国药典2010年版.二部[S].2010:461.
- [2] 张杰,向大雄,罗杰英.等.反相高效液相色谱法测定苦参药材中苦参碱的含量[J].中国医院药学杂志,2004,24(11):718.
- [3] 刘斌,石任兵,周素蓉.苦参汤有效部位总生物碱含量测定方法研究[J].北京中医药大学学报,2004,27(2):76.
- [4] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社.1975:2121.

[收稿日期]2011-02-26

[修回日期]2011-07-08

(上接第355页)

- [3] Ren B, Li SX, Deng B, et al. Determination of sirolimus in human whole blood by HPLC[J]. Chin Pharm J, 2004, 39(1):52.
- [4] Lee JH, Cha KH, Cho W, et al. Quantitative determination of sirolimus in dog blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and its applications to pharmacokinetic studies [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 53(4):1042.
- [5] 张东娣,范艳花.液-质联用在西罗莫司和依维莫司血药浓度监测中的应用进展[J].商丘师范学院学报,2007,23(12):90.
- [6] 时颖华,李中东,施孝金,等. HPLC法测定人全血中西罗莫司的浓度[J].中国临床药学杂志,2004,13(2):76.
- [7] 孙明辉,斯陆勤,翟雪珍,等.高效液相色谱-质谱联用测定大

鼠体内西罗莫司血药浓度[J].中国药学杂志,2010,45(2):132.

- [8] 祝仕清,牛长群. UPLC(超高效液相色谱)/MS/MS 联用技术测定全血中的西罗莫司[J].中国抗生素杂志,2007,32(6):347.
- [9] 董振南,贾兴旺,王玲,等.微粒子酶联免疫吸附法测定西罗莫司血药浓度的方法学评价[J].军医进修学院学报,2006,27(5):366.
- [10] 孙春华,黄建权,刘志鹏,等. HPLC-MS/MS 快速同时测定全血中3种免疫抑制剂的浓度[J].中国药学杂志,2008,43(21):1643.

[收稿日期] 2010-10-10

[修回日期] 2011-03-31