

· 药剂与炮制 ·

混料均匀设计优化四制香附活性成分配伍

胡律江¹, 许茜茜¹, 赵晓娟¹, 胡志方², 郭慧玲^{1*}, 王进诚¹

(1. 江西中医药大学, 南昌 333004; 2. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000)

[摘要] 目的:研究四制香附主要活性成分的配伍,提高活性成分抗痛经作用的生物效应。方法:采用混料均匀设计法拟定四制香附中3种主要活性成分香附烯酮,α-香附酮和 sugeonol 的配伍方案,运用 Powerlab 生物信号采集系统,记录小鼠离体子宫平滑肌的活动,采用平均张力变化为观察指标,探讨各活性成分与小鼠离体子宫抑制率之间的相关性,优化3种成分的配比关系。结果:当香附烯酮-α-香附酮-sugeonol(43:41:16)时,样品对由缩宫素引起的小鼠离体子宫痉挛性收缩的抑制率最高。结论:香附烯酮,α-香附酮和 sugeonol 之间存在明显的交互作用,配伍后的样品能显著提高抗痛经作用的生物效应,为四制香附抗痛经作用新剂型的研发及其临床应用提供实验依据。

[关键词] 四制香附; 活性成分; 混料均匀设计; 香附烯酮; α-香附酮

[中图分类号] R283.6;R284.1;R285.5;R289.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0001-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140001

Compatibility of Active Ingredients in Cyperi Rhizoma by Uniform Design of Experiments with Mixtures

HU Lyu-jiang¹, XU Qian-qian¹, ZHAO Xiao-juan¹, HU Zhi-fang², GUO Hui-ling^{1*}, WANG Jin-cheng¹
(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 333004, China; 2. Jiangxi Traditional Chinese Medical College, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** To study compatibility of active ingredients from Cyperi Rhizoma with Jianchangbang and examine interaction for increasing dysmenorrheal effects. **Method:** Compatible programs of active ingredients from Cyperi Rhizoma with Jianchangbang was developed by uniform design of experiments with mixtures. Uterine smooth muscle activity was recorded by Powerlab biological signal acquisition system in mice. Average tension changes were observed. Correlation between active ingredients and inhibition rates was explored to optimize relationship between ratios of these three components. **Result:** When ratio of cyperotundone, α-cyperone and sugeonol was 43:41:16, optimal integrated solution was obtained by establishing regression equation, contraction inhibition rate was highest by oxytocin-induced uterine spasmodic in mice. **Conclusion:** Cyperotundone, α-cyperone and sugeonol has significant interaction, dysmenorrheal effects of samples are increased significantly after compatibility of three components.

[Key words] Cyperi Rhizoma with Jianchangbang; active ingredients; uniform design of experiments with mixtures; cyperotundone; α-cyperone

香附具有理气和中、调经止痛的功效^[1]。从四制香附中分离得到了3个抗痛经作用活性成分(香附烯酮,α-香附酮和 sugeonol),其中α-香附酮是香附发挥解热镇痛作用的有效成分之一^[2],关于香附烯酮和 sugeonol 的药理作用研究较少。传统均匀设

计法在处方优化设计中所确定的各药物总用量不恒定,造成最后处方的总量也随之波动,从而导致给药体积或质量的不确定性^[3]。混料均匀设计是混料设计与均匀设计相结合的应用数学技术,该试验设计法既消除了配方间药物总量不相等的因素,又避

[收稿日期] 20141024(009)

[基金项目] 江西高等学校科技落地计划项目(KJLD14057);江西省卫生厅中医药科研计划重点项目(2013Z008)

[第一作者] 胡律江,讲师,从事中药炮制与中药新技术研究,E-mail:380085581@qq.com

[通讯作者] *郭慧玲,教授,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:0791-87118645,E-mail:ghl6262@126.com

免了试验点在试验范围内分布不均及试验点数不能任意确定等问题,为配方间等量药物的药效比较提供了更理想的试验条件。本实验拟采用混料均匀设计法筛选四制香附中 3 种抗痛经作用活性成分的最优配比,探讨三者相互作用关系,为四制香附抗痛经作用活性成分的临床应用提供参考。

1 材料

PowerLab 型生物信号采集系统(美国 AD 公司),BT25S 型 1/10 万电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。香附购自江西药都樟树中药饮片有限公司(产地江西,批号 11100105),经江西中医药大学药教研室邓可众教授鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* 的根茎;己烯雌酚片(合肥久联制药有限公司,批号 20100920),缩宫素(河南辅仁怀庆堂制药有限公司,批号 1105301),水为重蒸馏水,乙醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

昆明种清洁级小鼠,雌性(未孕),体重 18~22 g,由江西中医药大学动物中心提供,合格证号 SCXK(赣)2011-0001。

2 方法与结果

2.1 混料均匀设计

2.1.1 设计原理^[4] 在混料均匀设计中,各因素水平数都相同,每个配方的因素(自变量)取值(配方数据)之和为 1。若用 X_1, X_2, \dots, X_n 代表混料(配方)系统中 n 种成分各自所占百分比, y 为试验

指标,混料条件则可表示为 $X_i \geq 0 (i = 1, 2, \dots, n)$, $\sum_{i=1}^n X_i = X_1 + X_2 + \dots + X_n = 1$ 。其中 $X_i (i = 1, 2, \dots, n)$ 称为混料成分或混料分量,由配方数据建立回归模型,即配方回归,因自变量取值之和为 1,故自变量数比因素数少 1 个。在选定自变量与因变量后,对于某一个因变量,都可选用逐步回归分析法或自选变量法,建立配方线性回归、二次回归或三次回归模型。单个因变量的最优解(最大值或最小值)可由自变量范围直接求出。多个因变量的综合最优解,可运用规划求解的极值法或利用网格法求出。

2.1.2 试验配方设计 选用 $U_n(n^{s-1})$ 均匀设计表安排实验,其中 n 为试验次数和水平数, s 为待考察的因素数,故选择 $U_7(7^2)$ 均匀设计表,即对四制香附中 3 个活性成分各取 7 个不同水平并设计成 7 种配方进行考察。取使用表中规定的 2 列安排 3 种活性成分。具体算法为设 $U_n(n^{s-1})$ 为一个均匀设计表,用 q_{ji} 表示均匀表某列中的第 i 列($i = 1, 2, \dots, n$) 个数,将这些数进行换算。

$$C_{ji} = (2q_{ji} - 1) / 2n, j = 1, 2, \dots, s - 1。$$

将 $\{C_{ji}\}$ 转换成 $\{X_{ji}\}$, 计算公式为 $X_{ji} = (1 - c_{ji}^{s-1}) \prod_{k=1}^{j-1} c_{ki}^{\frac{1}{k}}$, $X_{si} = \prod_{k=1}^{s-1} c_{ki}^{\frac{1}{k}}$ 。 $k = 1, 2, \dots, s - 1$ 。 Π 表示各项的乘积。根据以上公式计算,组成了 7 组 $X_1 + X_2 + X_3 = 1$, 见表 1, 配比不同的活性成分配方。

表 1 四制香附活性成分混料均匀设计配比方案及其对未孕小鼠离体子宫肌收缩的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Different proportions of active ingredients from Cyperi Rhizoma and its impact on *in vitro* uterine muscle contraction of unfertilized mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组号	$U_7(7^2)$	C_1	C_2	X_1	X_2	X_3	抑制率/%
A	7 4	13/14	1/2	0.036	0.482	0.482	45.755 ± 12.909
B	1 3	1/14	5/14	0.733	0.172	0.095	52.744 ± 13.507
C	3 6	5/14	11/14	0.402	0.128	0.470	47.563 ± 12.886
D	6 2	11/14	3/14	0.114	0.696	0.190	44.480 ± 12.384
E	4 1	1/2	1/14	0.293	0.657	0.051	50.575 ± 13.824
F	2 5	3/14	9/14	0.537	0.165	0.298	51.250 ± 12.803
G	5 7	9/14	13/14	0.198	0.057	0.745	39.637 ± 7.729

2.2 供试品的配制 经过前期对四制香附效应成分的筛选^[5,6] 及其有效部位的成分分离,得到了 3 个抗痛经作用主要活性成分(X_1, X_2, X_3), 鉴定 X_1 为香附烯酮($C_{15}H_{22}O$), X_2 为 α -香附酮($C_{15}H_{22}O$), X_3 为 sugeonol($C_{15}H_{22}O_2$)。精密称取 X_1, X_2, X_3 各 4.0 mg, 加无水乙醇定容至 1 mL, 分别精密量取上述溶液 0.5 mL 用水定容至 1 mL, 得 $2.0 g \cdot L^{-1}$ 储备液, 备用。将各储备液按表 1 中不同体积比配成供试品(A~G), 备用。

2.3 小鼠离体子宫平滑肌收缩试验^[7] 取未孕雌性小鼠,于实验前连续 4 d 按 $2 \mu g \cdot g^{-1}$ 灌胃己烯雌酚,以同步化子宫并增加子宫的敏感性。第 5 天用颈椎脱臼法将小鼠处死,剪开腹腔,游离卵巢取出子宫置于充有混合气体(95% O_2 和 5% CO_2) 的 Loke'S 液(NaCl 9.2 g, KCl 0.42 g, $CaCl_2$ 0.24 g, $NaHCO_3$ 0.15 g, 葡萄糖 1.0 g, 溶于 1 L 水中, pH 7.3) 中清洗,从子宫颈端剪开,将子宫颈端固定于浴槽内固定器底部小钩上,卵巢端连接在张力换能

器上。置于含 Loke'S 液 10 mL 的恒温浴槽中,温度 $(37 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$, 通入 95% $\text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ 混合气体。通过调节螺母加负荷 2 g, 平衡 60 min, 每 10 min 换营养液 1 次, 待子宫收缩稳定且自发节律恢复后, 加入 $3.3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 缩宫素激动, 记录 15 min, 加入各供试品, 设对照组和样品组。记录给药后小鼠子宫肌张力的变化, 观察各供试品对缩宫素引起小鼠子宫痉挛各性收缩的对抗作用, 记录 10 min, 用 Loke'S 液冲洗 3 次, 进行下一次试验。

2.3.1 活性成分对离体子宫肌收缩的影响 在恒温平滑肌槽中温育肌条, 待子宫收缩稳定后, 对照组加 50% 乙醇 25 μL , 样品组分别加入活性成分储备液 25 μL , 统计各供试品给药前 15 min 和给药后 10 min 子宫收缩的肌张力, 计算对照组及样品组 (X_1, X_2, X_3) 的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 8$) 分别为 $(16.63 \pm 13.24)\%$, $(50.99 \pm 8.67)\%$, $(47.71 \pm 9.98)\%$, $(33.61 \pm 13.53)\%$ 。结果显示与对照组相比, 3 个活性成分对缩宫素引起的未孕小鼠离体子宫肌收缩都有明显的抑制作用, 差异具有统计学意义。

2.3.2 不同配比供试品对离体子宫肌收缩的影响 按 2.3.1 项下方法加入不同配比供试品 25 μL , 计算不同配比供试品的平均抑制率, 结果见表 1。

2.3.3 数据分析 采用 DPS 数据处理软件及二次多项式逐步回归模型^[8] 对试验数据进行分析, 得回归方程 $Y = 52.797 - 10.279X_1 - 28.626X_2^2 - 22.589X_3^2 + 65.569X_1X_2 + 17.609X_2X_3$ ($r = 0.9883$, $F = 1846.872$), Durbin-Watson 统计量 $d = 1.6655$, 显著水平 $P = 0.0177$, 说明该方程能很好地拟合 3 种活性成分的不同配比样品对小鼠离体子宫肌张力的影响。对该模型和回归系数进行显著性检验, 见表 2。结果显示各因素对小鼠离体子宫肌张力的影响作用的强弱顺序为 $X_1X_2 > X_2^2 > X_3^2 > X_2X_3 > X_1$, 且这些因素对小鼠离体子宫肌收缩的影响都很显著。根据回归方程, 令其一阶偏导数 = 0, 发现当香附烯酮- α -香附酮-sugeonol (43:41:16) 时, 样品对由缩宫素引起的小鼠离体子宫痉挛性收缩的抑制率最高, 最大抑制率 66.509%。

表 2 回归方程显著性分析

Table 2 Significance analysis of regression equation

因素	r	t 检验值	P
X_1	-0.990 2	7.087 1	0.019 3
X_2^2	-0.998 9	21.031 8	0.002 3
X_3^2	-0.998 2	16.498 8	0.003 7
X_1X_2	0.999 4	28.235 7	0.001 3
X_2X_3	0.992 0	7.863 9	0.015 8

3 讨论

活性成分是中药防病治病的物质基础, 让活性成分达到最高的生物效应是中药现代化研究的主要内容之一^[9]。本文以香附抗痛经作用活性成分为考察因素, 分析有效成分的配比方案, 优选最佳配比, 使香附抗痛经作用的生物效应大大提高。

为避免正交设计法和均匀设计法在处方优化中所确定的各药物总用量不恒定等问题, 本文采用混料均匀设计法对相同给药总量的活性成分进行配伍研究。结果表明香附烯酮, α -香附酮和 sugeonol 间有明显的协同作用, 且前两者的协同作用最为显著。在同等给药剂量的前提下, 配伍后的活性成分对小鼠离体子宫肌张力的抑制率显著高于活性成分单独给药。由于中药活性成分配伍排除了非药效物质的干扰, 有利于传统剂型向缓控释制剂、靶向制剂等新剂型的改革^[10]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 241.

[2] 邓远辉, 刘瑜彬, 罗淑文, 等. α -香附酮的分离及其解热镇痛作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 620-623.

[3] 刘清飞, 罗国安, 王义明. 混料均匀设计法在灯盏花素骨架片处方配比中的应用研究[J]. 中成药, 2006, 28(5): 632-635.

[4] 陈致印, 张盛贵, 牛黎莉, 等. 混料均匀设计优化枸杞粉稳定剂配比的研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 1-5.

[5] 胡律江, 郭慧玲, 胡志方, 等. 建昌帮四制香附对小鼠痛经模型的影响[J]. 江西中医药, 2011, 2(12): 66-67.

[6] 胡律江, 郭慧玲, 曾辉, 等. 基于 BP-ANN 模型的香附效应成分筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 27-30.

[7] 华永庆, 段金廛, 王言才, 等. 小鼠离体子宫收缩模型定量药理学研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(11): 1527-1530.

[8] 张超云, 赵清超, 黄显章, 等. 混料均匀设计法研究二陈汤的配伍机制[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(2): 387-389.

[9] 朱大元. 中药活性成分研究是中药现代化的重要组成部分[J]. 化学进展, 2009, 21(1): 24-29.

[10] 陈倩, 冯泳. 中药复方有效组分配伍的研究现状及思考[J]. 现代中医药, 2013, 33(5): 128-130.

[责任编辑 刘德文]