

痛风灵微丸处方药物组合优化的步骤与方法

冯乾坤,张 倩,李雪婷,王 沛*
(长春中医药大学,吉林 长春 130117)

[摘要] 目的:对治疗痛风病疗效确切的院内制剂痛风灵微丸的处方结构进行优化研究,为其临床前研究提供疗效可靠的优化处方,探索中药复方定量优化方法。**方法:**运用均匀设计改良法,以特异的药效学指标为评价指标,进行处方最佳配伍和最佳剂量配比的研究。**结果:**以均匀设计法得出痛风灵微丸的最佳配伍和最佳剂量配比的处方值。**结论:**该实验研究将拆方分析方法与最佳剂量配比研究结合起来,得到了比实践少 1 味药物的结论,并推荐其用于新药开发研究。

[关键词] 痛风灵;微丸;均匀设计;药物组合优化

[中图分类号] R285.5;R289.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0087-03

痛风灵微丸是由萆薢、土茯苓、茵陈、威灵仙、连翘、丝瓜络、车前子、木瓜等 8 味中药组成的医院制剂,具有清热祛风、温肾利湿、分清化浊的功效。药效学实验和临床应用均证明,其用于肾阳虚湿浊下注所致痛风病疗效确切^[1]。本文运用均匀设计改良法^[2]把拆方分析和最佳剂量配比研究结合起来,以特异的药效学指标为评价指标,进一步优化痛风灵微丸的处方结构和制备工艺,同时探索中药复方定量优化的方法。

1 材料

1.1 药物 处方中饮片均购自长春中医药大学附属医院药房。消炎痛(吲哚美辛肠溶片)批号:A-071101,山西云鹏制药有限公司。尿酸 SIGMA 公司产品。

1.2 动物 昆明种小鼠,体重(18~22)g,雌雄各半,购于长春生物制品研究所实验动物中心,许可证号:SCXK(吉)2007-001106 号。实验用 SD 大白鼠,体重(180~200)g,雌雄各半,购于长春生物制品研究所实验动物中心,许可证号:SCXK(吉)2007-201086 号。

1.3 制备工艺 每组药物先加 8 倍水浸泡,30 min,水煎煮 3 次,每次 1 h,合并滤液。按体重换算法算出小鼠给药剂量。以生药 g·kg⁻¹表示。

2 实验设计

2.1 评价指标 选择药效学评价指标为:①对尿酸钠所致大鼠痛风性关节炎的影响;②对醋酸所致小鼠扭体的影响。

2.2 药物组合和剂量配比优化研究的试验设计 采用均匀设计改良法将拆方分析和最佳剂量配比研究有机结合起来。本方由 8 种中药组成,君药和臣药从小到大分成 8 个水平剂量,其他各药从 0 到大分成 8 个水平剂量,设计 8 个水平,实验采用 U₈(8⁸)均匀设计表进行安排,同时加设空白对照组和阳性药物对照组。各剂量配比组药物的具体比例关系见表 1^[3]。

表 1 U₈(8⁸)均匀设计表(水平)

组别	药物剂量配比							
	药物 1	药物 2	药物 3	药物 4	药物 5	药物 6	药物 7	药物 8
1	5	1	2	2	6	5	1	3
2	6	7	6	3	8	1	4	6
3	8	5	3	8	3	2	5	2
4	1	2	4	7	7	4	6	7
5	7	4	5	5	1	7	2	8
6	2	6	8	6	5	6	3	1
7	4	8	1	4	4	8	8	5
8	3	3	7	1	2	3	7	4

评价方法通过对 8 组剂量配比关系的试验结果统计分析,得出实际效应最佳的配伍关系,并可明确最佳剂量配比。然后,将两项药效学指标进行综合效应比较分析,把试验结果输入均匀设计软件,经多元逐步回归分析,得出本方的最佳配伍关系和最佳

[收稿日期] 2009-06-05

[基金项目] 吉林省中医药管理局课题(08sys-033)

[通讯作者] *王 沛, Tel: (0431) 82225672; E-mail: Wapal988@163.com

剂量配比值。

2.3 数据处理 通过 t 检验比较各给药组与对照组差异显著性。并将试验结果输入均匀设计软件包 Qbasic, 经过多元逐步回归分析得出理论值。

3 方法与结果

3.1 痛风灵微丸基于均匀设计安排的 8 组方对尿酸钠所致大鼠痛风性关节炎的影响 SD 大鼠 200 只, 禁食不禁水 12 h, 按体重随机分为 10 组, 每组 20 只: 痛风灵微丸不同的配比 8 组, 加设空白对照组和阳性药物对照消炎痛组。各组动物 ig 给药或等体积蒸馏水 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日 1 次, 连续 5 d, 于末次给药后 30 min, 在每只大鼠右后足踝关节内注入 1.3% 尿酸钠混悬液(按 Seemiller 方法^[4], 将尿酸溶解与 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中, 以 HCl 调整 pH, 经搅拌、过滤、低温干燥、筛选、消毒, 得无菌尿酸钠结晶。) $50 \mu\text{L}$ 致炎, 致炎后每小时测各鼠右踝关节下 0.5 mm 处直径 1 次, 连续测 7 次, 以致炎前后测定差值为关节肿胀程度。结果见表 2。

表 2 不同药物剂量对比对尿酸钠所致大鼠
痛风性关节炎的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	7 次平均肿胀度 (mm)	肿胀百分率 (%)
空白对照组	-	12.8 ± 1.83	100.0
消炎痛组	0.010	$6.0 \pm 1.60^{1)}$	46.9
药物剂量配比 1	1.915	10.7 ± 1.53	83.6
2	3.472	$7.8 \pm 2.03^{1)}$	60.9
3	3.250	$7.6 \pm 1.68^{1)}$	59.4
4	2.777	10.5 ± 1.65	82.0
5	3.333	$8.8 \pm 1.23^{1)}$	68.8
6	2.833	9.6 ± 1.69	75.0
7	3.333	$8.6 \pm 1.80^{1)}$	67.2
8	2.166	11.1 ± 2.04	86.7

注: 与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (下同)

3.2 痛风灵微丸基于均匀设计安排的 8 组方对醋酸所致小鼠扭体的影响 取小鼠 200 只, 雌雄各半(雌者无孕), 体重(20 ± 2) g。随机分为 10 组, 每组 20 只: ig 给药剂量及天数同 3.1。末次给药后 50 min, 腹腔注射 0.7% 醋酸 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。记录 15 min 内小鼠扭体次数。结果见表 3。

从表 2, 表 3 试验结果可见, 平均肿胀度以药物剂量配比 2 组和 3 组效果最佳; 扭体次数以药物剂量配比 2 组、5 组效果为好。综合分析两种试验结果, 确定药物剂量配比 2 组疗效最佳。

表 3 不同药物剂量对比对醋酸所致小鼠扭体的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	扭体次数 (min^{-1})	扭体频率 (%)
空白对照组	-	25.40 ± 3.21	100.00
阿斯匹林组	0.250	$8.83 \pm 1.08^{3)}$	34.76
药物剂量配比 1	1.915	21.66 ± 1.88	85.27
2	3.472	$12.44 \pm 1.64^{2)}$	48.98
3	3.250	$19.12 \pm 1.94^{1)}$	75.28
4	2.777	20.86 ± 2.02	82.13
5	3.333	$12.34 \pm 2.65^{2)}$	48.58
6	2.833	20.88 ± 1.28	82.20
7	3.333	$18.98 \pm 1.61^{1)}$	74.72
8	2.166	22.50 ± 1.43	88.58

将上述试验结果输入均匀设计软件, 经过多元逐步回归分析, 得出:

以平均肿胀度为指标, 回归方程为:

$$Y = 6.503351 - 0.0114358X_7 + 0.000107914X_2^2 + 0.00414105X_1X_2 - 0.000861892X_1X_7 + 0.00298618X_2X_4 + 0.00124995X_4X_5$$

根据回归方程, 以平均肿胀度为指标的最佳药物组成为:

药物 1: 50.00 g, 药物 2: 30.00 g, 药物 3: 12.0367 g, 药物 4: 20.00 g, 药物 5: 20.00 g, 药物 6: 19.8459 g, 药物 7: 0.00 g, 药物 8: 1.2187 g。

以扭体次数为指标, 回归方程为:

$$Y = -1.521370 + 0.00491653X_4^2 + 0.00009056686171X_1X_3 + 0.014203544291X_1X_8 + 0.009855726444X_2X_5 - 0.0016787650819X_2X_6 - 0.0010046567425X_4X_8$$

根据回归方程, 以扭体次数为指标的最佳药物组成为:

药物 1: 50.00 g, 药物 2: 30.00 g, 药物 3: 30.00 g, 药物 4: 20.00 g, 药物 5: 20.00 g, 药物 6: 0.00 g, 药物 7: 2.4823 g, 药物 8: 20.00 g。

式中: Y_1 为平均肿胀度, Y_2 为扭体次数; $X_1 \sim X_8$ 分别代表, 药物 1 ~ 药物 8。

3.3 两项药效学指标综合效应的比较分析 在优化过程中, 需要对两项指标进行综合考虑和权衡, 故设计了一个综合指标(overall desirability, OD), 将两个指标统一综合考察, 以综合指标进行多元逐步回

归分析,得出最佳配伍关系和最佳剂量配比的理论值。在计算综合指标之前,需先将各指标进行格式化。两项指标平均肿胀度和扭体次数均能够反映药物对机体的作用。据此分别赋以平均肿胀度(n)权重定为 0.60,扭体次数(t)权重定为 0.40, $OD = (0.6 \times n_i/n_{max} + 0.4 \times t_i/t_{max}) \times 100\%$,以此进行直观分析和统计分析,综合评分结果见表 4。

表 4 两项药效学指标综合评分

组别	平均肿胀度 (n)	扭体次数 (t)	综合评分 (OD)
药物剂量配比 1	10.7	21.66	15.732
2	7.8	12.44	43.868
3	7.6	12.34	34.248
4	10.5	20.86	17.948
5	8.8	19.12	39.288
6	9.6	20.88	22.12
7	8.6	18.98	29.792
8	11.1	22.50	12.548

从表 4 试验结果可见,以综合效应(OD)为指标看,药物剂量配比 2 组、5 组和 3 组效果较好;同时结合实际操作的其他因素一同考虑,确定药物剂量疗效最佳配比。

将上述结果输入均匀设计软件,得出:

以综合效应(OD)为指标,回归方程为:

$$Y = 13.24964064 - 0.23511539884X_6 - 0.0013174823889X_4^2 + 0.05073316428X_1X_2 - 0.030345554674X_1X_7 + 0.005686267261X_3X_8 + 0.03723402553X_4X_6$$

根据回归方程,以综合指标为指标的最佳药物组成为:

药物 1: 50.00 g, 药物 2: 30.00 g, 药物 3: 29.8177 g, 药物 4: 20.00 g, 药物 5: 15.4399 g, 药物 6: 20.0 g, 药物 7: 0.00 g, 药物 8: 13.9586 g。

4 讨论

痛风灵微丸采用均匀设计改良法,进一步优化痛风灵微丸处方结构,实验结果表明,药物剂量配比为药物 1,2,3,4,5,6,8 组成的药效最佳,较实际应用组方药味少 1 种;且组方中各药物的剂量基本与实际临床应用的组方剂量基本一致(君药和臣药基本没有变化,佐药有些变化)。故可推荐用于后续新药开发研究。

将均匀设计改良法用于中药材复方优化研究,我们认为有以下几点好处:1)均匀设计法将数论和多元统计相结合,适用于多因素、多水平的实验研究;2)该方法舍弃了正交设计的“整齐可比”的特点,而让试验点在试验范围内充分“均匀分布”,所以需安排的试验次数仅与水平数相等(而正交设计试验次数是水平数平方的整数倍),大大减少了试验次数,节省了时间和经费;3)在各水平数的设计上,将各佐药(非主要)的因素最低剂量设为“0”,把不同剂量配比研究同拆方分析两者有机结合起来,既可减少试验次数,又科学合理,为新药开发提供理论支持。

综合评分法广泛应用研究于药学领域,将其引入处方优化的实验研究,可解决多指标间可能存在的矛盾问题,使各因素水平的贡献具有均等的机会。

对各药效学指标数据进行综合评分,在优化过程中可以对各个指标进行综合考虑和权衡。本研究设计了一个综合指标,将各个指标根据不同的权重统一综合考察把多指标化为单一指标输入软件包,得出最佳药物配比综合效应的结果,再进行后续研究。

中药复方配伍关系和剂量配比关系是影响疗效的两个重要环节,是方剂优化研究中的重要方法学问题,也是实现中药现代化必须解决的关键性问题之一。目前中药复方的组成和剂量安排基本上都是借助经验一次性确定下来而不再变更。中药品种总体疗效不甚理想与此直接相关。因此,遵循中医药理论,在临床实践和药效学评价的基础上,正确运用优化研究方法,进一步优化处方结构和最佳剂量配比关系,可望开发出疗效卓著的中药材复方制剂。

[参考文献]

[1] 刘齐林,何欢,赵士彦,等. 痛风灵抗炎、镇痛、抗痛风作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,2(15): 74.

[2] 梁茂新,李东安. 均匀设计在中药小复方精选中的改良应用[J]. 世界科学技术——中药现代化,2006,8(2):53.

[3] 张春华,严云良. 医药数理统计[M]. 北京:科学出版社,2001:270.

[4] Pascualo E. Gout update:from lab fo the chlinic and back [J]. Curr Opin heumatol,2004, 12:213.