

星点设计-效应面法优化双苷清咽含片处方的研究^{*}

黄云¹, 李学坚^{1*}, 胡文姬², 刘布鸣³, 邱宏聪³

(1. 广西中医药大学科学实验中心, 广西南宁 530200; 2. 武汉市中医医院, 湖北武汉 430014; 3. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要: 研究芒果苷、罗汉果甜苷和薄荷脑对双苷清咽含片抗炎药效的贡献, 优选出该含片的最优处方。以小鼠腹腔通透性和二甲苯致小鼠耳廓肿胀度为指标, 采用星点设计-效应面优化法, 研究芒果苷、罗汉果甜苷和薄荷脑的用量对双苷清咽含片抗炎药效的影响。结果表明, 对抗炎药效影响的主次顺序为芒果苷 > 罗汉果甜苷 > 薄荷脑; 星点设计-效应面法优化法给出的优化处方范围为芒果苷占素片片重 8.50%~17.50%; 罗汉果甜苷占 6.37%~13.13%, 薄荷脑占 0.18%~0.42%; 最优处方为芒果苷占素片片重 13.00%, 罗汉果甜苷占 9.75%, 薄荷脑占 0.30%。应用星点设计-效应面优化法可快速准确地给出双苷清咽含片的最优处方; 双苷清咽含片的抗炎药效主要取决于芒果苷和罗汉果甜苷的用量, 薄荷脑的用量无显著影响。

关键词: 双苷清咽含片 抗炎作用 星点设计-效应面优化法 处方优化

中图分类号: R283.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2019)05-0588-06

0 引言

芒果苷是漆树科植物芒果叶的活性成分, 其药理作用十分广泛但均甚弱, 无法单独开发成药物。作者将芒果苷与罗汉果甜苷、薄荷脑进行配伍, 研制具有抗炎、化痰、清咽功效的新药双苷清咽含片(SGQY tablet), 该含片药物直接作用于咽喉病灶, 避免药物的首过效应, 可提高药物的生物利用度。这无论是对研究芒果苷的成药性还是拓宽芒果苷的应用途径, 均具有重要的促进作用。芒果苷具有抗炎、祛痰、镇咳、平喘等作用^[1]。罗汉果甜苷是广西道地药材罗汉果的活性部位, 具有化痰、止咳、抗氧化等作用^[2]; 罗汉果甜苷为低热量型甜味剂, 在食品和药品研发中作为矫味剂得到广泛应用^[3]。薄荷脑是中药材薄荷挥发

油的结晶物, 具有抗炎等药理作用^[4]。为了弄清芒果苷、罗汉果甜苷和薄荷脑的最佳用量配比, 本研究对双苷清咽含片的处方进行优化。采用星点设计-效应面优化法^[5], 运用 Design-expert 8.0.5 软件中的星点设计方法(Central composite design, CCD)和分析方法, 结合动物体内抗炎药效试验结果, 分析评价芒果苷、罗汉果甜苷和薄荷脑在双苷清咽含片抗炎药效中的贡献, 对含片处方进行优化, 为最终确定新药双苷清咽含片的处方提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

昆明种小鼠, 雄性, 18~22 g, 由广西医科大学实

^{*} 广西中药质量标准研究重点实验室开放课题基金项目(GXGZZK201102 和桂中重开 201507)资助。

【作者简介】

黄云(1988—), 女, 药师, 主要从事中药检验与分析研究。

【* * 通信作者】

李学坚(1965—), 男, 教授级高级工程师, 主要从事中药新产品研发工作, E-mail: 1211856948@qq.com。

【引用本文】

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20191024.006

黄云, 李学坚, 胡文姬, 等. 星点设计-效应面法优化双苷清咽含片处方的研究[J]. 广西科学, 2019, 26(5): 588-593.

HUANG Y, LI X J, HU W J, et al. Prescription optimization of Shuangganqingyan tablet by central composite design-response surface methodology [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(5): 588-593.

验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK 桂 2009-0002, 动物饲养于空调室内, 室温(22±2)℃, 相对湿度(60±5)%, 饲喂标准颗粒饲料, 自由饮水和摄食。

1.1.2 药物及试剂

芒果苷(批号: 20130611, 广西邦尔植物制品有限责任公司); 罗汉果甜苷(批号: 20140810, 广西桂林三宝药业有限公司); 薄荷脑(批号: 140221, 黄山天目薄荷药业有限公司); 二甲苯(AR级, 批号: 120621, 广州苏喏化工有限公司); 冰乙酸(AR级, 批号: 20121017, 成都市科龙化工试剂厂); 伊文思兰(AR级, 批号: 130925, 嘉兴市精博化学品有限公司); 生理盐水(批号: H14070405, 贵州天地药业有限责任公司)

1.1.3 仪器

EL204型分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); WHX微型漩涡混合器型(上海跃进医疗器械厂); KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ST16R型 Thermo离心机(赛默飞世尔科技-实验室产品(德国)); UV1800紫外可见分光光度计(日本岛津公司); J02011型打孔器(广州市捷星教学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 处方优化的实验设计

取含片中的3个活性成分芒果苷(X1)、罗汉果甜苷(X2)、薄荷脑(X3)为抗炎药效的影响因素。文献[1-2]报道芒果苷和罗汉果甜苷抗炎、化痰作用的最低起效剂量(Dmin)分别为100 mg·kg⁻¹, 75 mg·kg⁻¹; 分别取1/2 Dmin和2 Dmin为极小值和极大值, 并换算成占含片素片片重的比例: 芒果苷5.20%~20.80%, 罗汉果甜苷3.90%~15.60%。薄荷脑在含片中的主要作用是矫味剂, 根据前期研究结果, 适用范围为素片片重的0.10%~0.50%。用Design-Expert 8.0.5软件计算出各因素的水平, 如表1。

表1 星点设计试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of central composite design

Analytical factors (%)	Coded symbols	Levels				
		-1.732	-1	0	1	1.732
Mangiferin	X1	5.20	8.50	13.00	17.50	20.80
Mogroside	X2	3.90	6.37	9.75	13.13	15.60
Menthol	X3	0.10	0.18	0.30	0.42	0.50

1.2.2 对小鼠腹腔通透性及二甲苯致小鼠耳廓肿胀度的影响^[1]

1.2.2.1 受试药物溶液的制备

软件系统按表1生成20组芒果苷、罗汉果甜苷和薄荷脑的用量组合(处方)。按处方分别精密称取芒果苷、罗汉果甜苷和薄荷脑, 置于小瓶中, 不加含片成型辅料, 直接加入生理盐水10 mL, 涡旋混合3 min后, 超声处理10 min使之充分混合, 作为受试药物悬液。

1.2.2.2 动物试验

取小鼠200只, 随机分为20组, 每组10只。每组小鼠按0.2 mL·10 g⁻¹体重每天i. g(经口灌胃)给药, 连续7 d。末次给药1 h后, 给各鼠按0.1 mL·10 g⁻¹体重尾静脉注射0.2%伊文思兰溶液。将二甲苯0.05 mL滴于小鼠右耳, 左耳滴0.05 mL的生理盐水作空白对照。继而i. p(腹腔注射给药)0.6%冰醋酸, 0.2 mL/只。

1.2.2.3 小鼠耳廓肿胀度的测定

末次给药后15 min, 脱颈椎处死小鼠, 沿耳廓基部剪下左右两耳, 用直径6 mm打孔器分别在两耳的同一部位打下圆形耳片, 立即分别称重(W)。左、右耳片的重量差值即为耳廓肿胀度Y1, 算式如下: $Y1 = W_{右耳} - W_{左耳}$ 。

1.2.2.4 小鼠腹腔通透性的测定

对小鼠i. p 6 mL生理盐水进行清洗, 收集腹腔液于3 000 r/min离心5 min。取上清液于紫外-可见分光光度计590 nm处测定OD值(Y2)。

1.2.2.5 数据处理

实验设计、因素水平计算、实验数据处理, 均采用Design-Expert 8.0.5软件进行。

2 结果与分析

2.1 处方优化及多元线性拟合

双苷清咽含片的不同处方及其效应如表2所示。

表2 双苷清咽含片的不同处方及其效应值

Table 2 Different prescriptions and their response values of SGQY tablet

Run	Factor 1 A: X1	Factor 2 B: X2	Factor 3 C: X3	Response 1 Y1(mg)	Response 2 Y2(u)
1	17.50	6.37	0.18	1.79	0.071 6
2	13.00	9.75	0.30	2.08	0.085 0
3	17.50	6.37	0.42	1.81	0.079 0
4	13.00	9.75	0.10	2.13	0.086 1
5	20.80	9.75	0.30	1.58	0.060 2
6	13.00	15.60	0.30	2.06	0.081 8
7	13.00	9.75	0.30	2.11	0.085 7

续表 2

Continued table 2

Run	Factor 1 A:X1	Factor 2 B:X2	Factor 3 C:X3	Response 1 Y1(mg)	Response 2 Y2(u)
8	8.50	6.37	0.42	3.95	0.125 9
9	13.00	9.75	0.30	1.83	0.084 3
10	8.50	13.13	0.42	3.86	0.115 7
11	5.20	9.75	0.30	4.33	0.142 1
12	13.00	9.75	0.30	2.02	0.084 9
13	13.00	3.90	0.30	2.26	0.089 2
14	13.00	9.75	0.30	1.87	0.085 1
15	17.50	13.13	0.42	1.69	0.069 7
16	13.00	9.75	0.30	1.95	0.085 0
17	8.50	13.13	0.18	4.07	0.116 9
18	17.50	13.13	0.18	1.75	0.070 1
19	13.00	9.75	0.50	1.99	0.083 8
20	8.50	6.37	0.18	4.28	0.127 6

表 3 Y1 的方差分析

Table 3 Variance analysis of Y1

Source	SS	df	MS	F	P
Model	15.35	9	1.71	16.11	<0.000 1
X1	12.04	1	12.04	113.70	<0.000 1
X2	4.552E-004	1	4.552E-004	4.298E-003	0.021 3
X3	0.21	1	0.21	2.00	0.187 5
X1X2	0.072	1	0.072	0.68	0.428 2
X1X3	0.25	1	0.23	2.31	0.159 2
X2X3	0.11	1	0.11	1.04	0.331 2
X1 ²	2.52	1	2.52	23.83	0.000 6
X2 ²	0.29	1	0.29	2.74	0.128 8
X3 ²	0.16	1	0.16	1.54	0.242 3
Residual	1.06	10	0.11		
Lack of fit	0.99	5	0.20	14.21	0.005 6
Pure error	0.070	5	0.014		
Cor total	16.41	19			

表 4 Y2 的方差分析

Table 4 Variance analysis of Y2

Source	SS	df	MS	F	P
Model	8.998E-003	9	9.998E-004	57.49	<0.000 1
X1	8.139E-003	1	8.139E-003	467.99	<0.000 1
X2	1.429E-004	1	1.429E-004	821	0.016 8
X3	9.658E-010	1	9.658E-010	5.554E-005	0.994 2
X1X2	1.275E-005	1	1.275E-005	0.73	0.411 9
X1X3	1.225E-005	1	1.225E-005	0.70	0.420 9
X2X3	6.661E-006	1	6.661E-006	0.38	0.549 8
X1 ²	6.790E-004	1	6.790E-004	39.04	<0.000 1
X2 ²	2.972E-005	1	2.972E-005	1.71	0.220 4
X3 ²	2.136E-005	1	2.136E-005	1.23	0.293 7
Residual	1.739E-004	10	1.739E-005		
Lack of fit	1.720E-004	5	3.439E-005	88.26	<0.000 1
Pure error	1.948E-006	5	3.897E-007		
Cor total	9.172E-003	19			

采用软件对表 2 的数据进行多元线性回归和方差分析;方差分析结果见表 3~4,二次多项式方程如下:

$$Y1 = 11.51254 - 0.80978 \times X1 - 0.30901 \times X2 - 7.80428 \times X3 + 1.15550E-003X1 \times X2 + 0.12019X1 \times X3 + 0.012876 \times X2 \times X3 + 0.020855 \times X1^2 + 0.013964 \times X2^2 + 9.34524 \times X3^2 (P < 0.000 1, R^2 = 0.991 5);$$

$$Y2 = 0.25132 - 0.015322 \times X1 - 3.68521E-003 \times X2 - 0.061111 \times X3 + 8.33608E-005 \times X1 \times X2 + 2.37981E-003 \times X1 \times X3 - 2.34979E-003 \times X2 \times X3 + 3.24583E-004 \times X1^2 + 1.20765E-004 \times X2^2 + 0.088690 \times X3^2 (P < 0.000 1, R^2 = 0.987 2)。$$

方差分析结果显示,抑制小鼠耳廓肿胀度的主次顺序、以及对小鼠腹腔通透性影响的主次顺序,同为 $X1 > X2 > X3$, 即芒果苷 > 罗汉果甜苷 > 薄荷脑, 其中芒果苷具有极显著影响 ($P < 0.0001$), 罗汉果甜苷具有显著影响 ($P < 0.05$), 薄荷脑无统计学显著意义 ($P > 0.05$); 模型回归方程具有显著意义, 失拟项结果不显著, 说明回归方程良好; 方程中 $X1$ 、 $X2$ 、 $X3$ 、 $X1^2$ 、 $X2^2$ 和 $X3^2$ 项为三因素对各效应的单独作用, $X1X2$ 、 $X1X3$ 、 $X2X3$ 项为两因素的交互作用。

由此可见,对双苷清咽含片抗炎药效的影响因素中,芒果苷的影响极大,罗汉果甜苷有显著影响,薄荷脑无显著影响。

2.2 效应面描绘与分析

分别固定3个自变量中的一个为中值,绘制Y1和Y2的三维等高线效应面图(图1~6)。

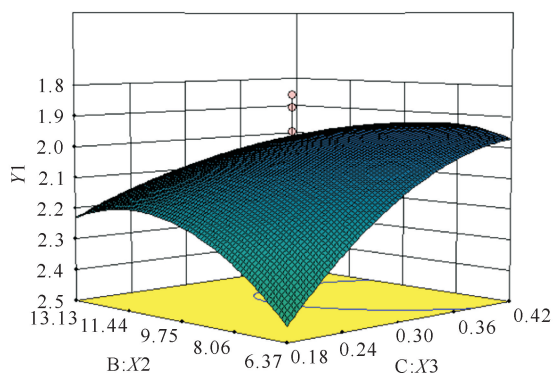


图1 Y1 效应面(罗汉果甜苷-薄荷脑,固定芒果苷 = 13.00%)

Fig. 1 Response surface of Y1(mogroside via menthol, mangiferin=13.00%)

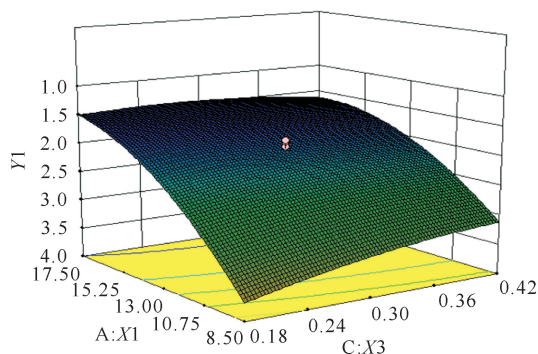


图2 Y1 效应面(芒果苷-薄荷脑,固定罗汉果甜苷 = 9.75%)

Fig. 2 Response surface of Y1(mangiferin via menthol, mogroside=9.75%)

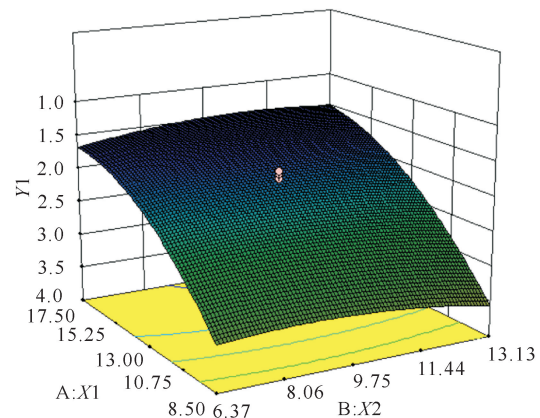


图3 Y1 效应面(芒果苷-罗汉果甜苷,固定薄荷脑 = 0.30%)

Fig. 3 Response surface of Y1(mangiferin via mogroside, menthol=0.30%)

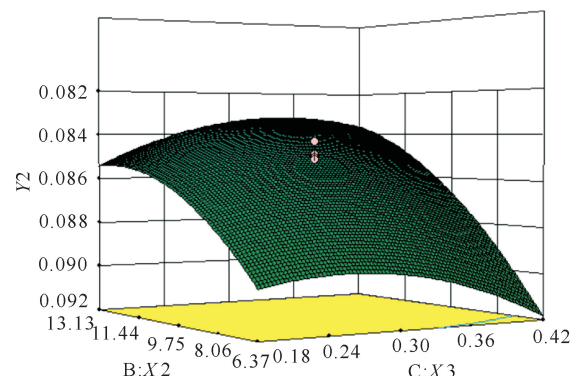


图4 Y2 效应面(罗汉果甜苷-薄荷脑,固定芒果苷 = 13.00%)

Fig. 4 Response surface of Y2(mogroside via menthol, mangiferin=13.00%)

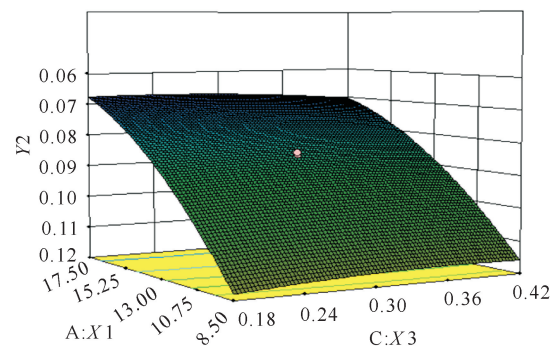


图5 Y2 效应面(芒果苷-薄荷脑,固定罗汉果甜苷 = 9.75%)

Fig. 5 Response surface of Y2(mangiferin via menthol, mogroside=9.75%)

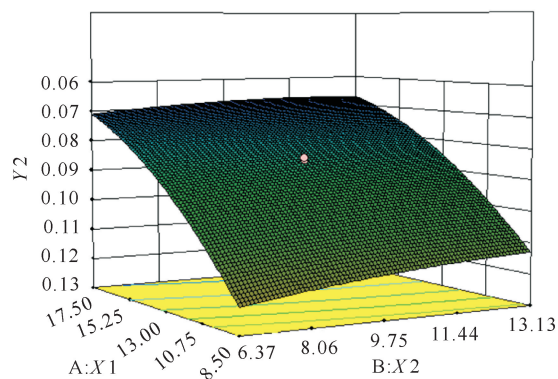


图6 Y2 效应面(芒果苷-罗汉果甜苷, 固定薄荷脑=0.30%)

Fig. 6 Response surface of Y2 (mangiferin via mogroside, menthol=0.30%)

以上6个图显示, Y1 效应面的曲面变化程度依次为图1>图2>图3, Y2 效应面的曲面变化程度依次为图4>图5>图6, 说明无论是对抑制小鼠耳廓肿胀度的影响, 还是对小鼠腹腔通透性的影响, 因素

表5 双苷清咽含片处方优化结果

Table 5 Optimization results of SGQY tablet prescription

Analytical Factors	Coded symbols	Level (%)	Low level (%)	High level (%)	Std. dev.	Coding (%)
Mangiferin	X1	13.00	8.50	17.50	0.000	Actual
Mogroside	X2	9.75	6.37	13.13	0.000	Actual
Menthol	X3	0.30	0.18	0.42	0.000	Actual
Response	Prediction	Std Dev.	SE(n=1)	95% PI low	95% PI high	
Y1(mg)	1.98	0.325	0.351	1.197	2.763	
Y2(u)	0.085	0.004	0.005	0.075	0.095	

3 讨论

正交试验优化方法采用线性数学模型拟合, 存在实验次数少、精度不高、建立的数学模型预测性不佳等问题, 其优化结果仅得出一个既定的点(由开展正交试验前拟定的水平和因素所确定)。而采用星点设计-效应面优化法建立的数学模型及其效应面, 给出的优化结果是一个区域范围, 给处方优化有更多的选择; 效应面具有直观、方便、预测性精确等的优点。

薄荷脑虽然具有抗炎作用, 其最低起效剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [4], 但在双苷清咽含片中是作为矫味剂使用, 用量极少, 给予小鼠的剂量不足 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 故其用量与抗炎药效间未呈现“量-效关系”。相反, 双苷清咽含片的抗炎药效主要取决于芒果苷和罗汉果甜苷的用量, 且呈良好的“量-效关系”。

双苷清咽含片的处方在前期研究中曾采用正交试验方法进行了优化[6], 结果为芒果苷占含片素片片

的影响大小排序均为芒果苷>罗汉果甜苷>薄荷脑, 与方差分析结果相一致。

2.3 处方优化结果

通过软件系统的优化计算, 双苷清咽含片的处方优化结果见表5。处方最优范围为(占素片片重): 芒果苷 8.50%~17.5%, 用量越大越好; 罗汉果甜苷 6.37%~13.13%, 用量越大越好; 薄荷脑 0.18%~0.42%, 用量对抗炎药效没有显著影响。结合文献[1-2]报道的剂量, 芒果苷和罗汉果甜苷均取其最低起效剂量, 换算成占含片素片片重, 分别为 13.00% 和 9.75%, 薄荷脑取其中值即 0.30%, 得到最优处方为(占素片片重): 芒果苷 13.00%, 罗汉果甜苷 9.75%, 薄荷脑 0.30%。软件系统据此最优处方预测的 Y1 和 Y2 的值分别为 1.98 和 0.085, 与表 2 第 2, 7, 9, 12, 16 号试验的实测 Y1 和 Y2 相似, 说明最优处方是可行的。

重 10.40%、罗汉果甜苷占 7.80%、薄荷脑占 0.30%; 本次采用星点设计-效应面法优化结果为芒果苷占含片素片片重 13.00%, 罗汉果甜苷占 9.75%, 薄荷脑占 0.30%。两次优化结果虽然相近, 但略有差异。正交设计是一种高效、多因素优化实验设计, 利用正交表将影响因素和因素水平进行组合和均匀搭配, 可大大减少实验次数; 而星点设计-效应面优化法主要考察自变量对效应的作用并对其进行优化, 要求自变量必须连续且可被实验者准确控制[7]。由此可见, 较前一次优化, 本次结果应更为精确。

4 结论

星点设计-效应面优化法的二次回归模型预测性好, 可快速准确地给出双苷清咽含片的最优处方; 双苷清咽含片的抗炎药效主要取决于芒果苷和罗汉果甜苷的用量, 薄荷脑的用量无显著影响。

参考文献

- [1] 邓家刚, 郑作文, 曾春晖. 芒果苷的药效学的实验研究[J]. 中医药学刊, 2002, 20(6): 802-803.
- [2] 张庆莲, 黄娟, 吴智慧, 等. 罗汉果的药理及开发应用的研究概况[J]. 药学研究, 2017, 36(03): 164-165, 186.
- [3] 李雨蒙, 张泽生, 秦程广, 等. 罗汉果甜苷的提取及活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(8): 220-224.
- [4] 梅全喜, 钟希文, 高玉桥, 等. 浓薄荷水抗炎作用研究[J]. 中国药业, 2008, 17(21): 11-12.
- [5] 吴云娟, 沙先谊, 李婵, 等. 星点设计-效应面优化法优化三七总皂苷鼻腔用粉雾剂[J]. 中成药, 2005, 27(1): 10-15.
- [6] 胡文姬. 双苷清咽含片的制备工艺研究及主要药效研究[D]. 广西中医药大学, 2014: 1-69.
- [7] 邱颖, 朱玲, 孙晓英. 星点设计-效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用[J]. 海峡药学, 2011, 23(2): 18-20.

Prescription Optimization of Shuangganqingyan Tablet by Central Composite Design-Response Surface Methodology

HUANG Yun¹, LI Xuejian¹, HU Wenji², LIU Buming³, QIU Hongcong³

(1. Guangxi Scientific Research Center of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China; 2. Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei, 430014, China; 3. Guangxi Quality Standard of Chinese Medicine Research Laboratory, Nanning, Guangxi, 530022, China)

Abstract: To study the contribution of mangiferin, mogrosin and menthol to the anti-inflammatory effects of Shuangganqingyan tablet (SGQY tablet), it is preferred to prescribe the optimal formulation of this tablet. Mouse auricle tumefaction and abdominal capillary permeability were determined, and central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) optimization tests were utilized to study the dosages of mangiferin, mogrosin and menthol on the anti-inflammatory effects of SGQY tablet. The results showed that the main order of anti-inflammatory effects was mangiferin > mogrosin > menthol. The optimized prescription range given by central composite design-response surface methodology method was that mangiferin accounted for 8.50% to 17.50% of the tablet weight, mogrosins accounted for 6.37%—13.13%, and menthol accounted for 0.18%—0.42%. The optimal prescription was that mogrosin occupied accounted for 13.00% of the tablet weight, mogrosins accounted for 9.75%, and menthol accounted for 0.30%. The application of CCD-RSM method can quickly and accurately give the optimal prescription of SGQY tablet. The anti-inflammatory effect of SGQY tablet depends mainly on the amount of mangiferin and mogrosin, the amount of menthol used has no significant effect.

Key words: Shuangganqingyan tablet (SGQY tablet), anti-inflammatory effects, central composite design-response surface methodology (CCD-RSM), prescription optimization

责任编辑: 陆雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>