

均匀设计法筛选三七、山楂有效部位 组合物剂量配比

贺燕,温富春,纪凤兰,丁涛,徐惠波*
(吉林省中医药科学院,长春 130021)

[摘要] 目的:研究确定三七、山楂(SS)组合物中2个有效部位最佳配比剂量的有效方法。方法:按照 $U_6(6^4)$ 表将小鼠随机分为山楂叶总黄酮:三七叶总皂苷 200:15,100:1.875,50:30,25:3.75,12.5:60,6.25:7.5($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)6个剂量给药组,连续给药5d后,采用小鼠腹腔注射异丙肾上腺素和断头致急性脑缺血两种模型观察小鼠存活时间,分别得出多元回归方程,推算2个有效部位的最佳配比。结果:确定SS组合物中山楂叶总黄酮:三七叶总皂苷最佳组合比例为20:15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,即配比为4:3,此时药效作用明显($P<0.05$)。结论:运用均匀设计与药效学验证相结合的方法可确定有效部位组合物的最佳配比。

[关键词] 三七;山楂;有效部位组合物;均匀设计

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0248-04

Uniform Design for Optimizing Proportion of Effective Components from *Panax Notoginseng* and *Crataegus pinnatifida* Bge.

HE Yan, WEN Fu-chun, JI Feng-lan, DING Tao, XU Hui-bo*
(Jilin Academy of Chinese Medical Science, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effective way to optimize the proportion of effective components from *Panax notoginseng* and *Crataegus pinnatifida* Bge. **Method:** According to table $U_6(6^4)$ in uniform design, mice were divided into 6 treatment groups, the ratios between flavonoids of *Crataeguspinnatifida* and total saponins of *P. notoginseng* were 200:15, 100:1.875, 50:30, 25:3.75, 12.5:60, 6.25:7.5 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) accordingly. The treatments lasted for 5 days. Then, survival time of mice were evaluated by two models, isoproterenol injection

[收稿日期] 20120305(014)

[基金项目] 吉林省科技厅重点项目(20060907-01)

[第一作者] 贺燕,硕士,主治医师,从事药理学研究工作,Tel:0431-86816880,E-mail:yebaihe-yan@163.com

[通讯作者] *徐惠波,研究员,从事新药研发工作,Tel:0431-86058637,E-mail:lxuhiboyao@yahoo.com.cn

[13] 王成章,沈兆邦,郑光耀,等. 银杏叶聚戊烯基磷酸酯体内外抗肿瘤的生物活性研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(3):13.
[14] 王成章,沈兆邦,高凌. 银杏叶聚戊烯醇抗肿瘤的生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5):18.
[15] 黑子清,吴伟康,孙惠兰,等. 银杏叶提取物对高脂胆固醇喂饲家兔血管神经酰胺含量和泡沫细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2):60.
[16] Marit K, Henriette C S, H é la S, et al. The G_1 -S

checkpoint in fission yeast is not a general DNA damage checkpoint [J]. Cell Sci, 2008 121(8):4047.
[17] Ver ó nica R B, Sandra G E, Noelia Sr, et al. Different S/M checkpoint responses of tumor and non-tumor cell lines to DNA replication inhibition [J]. Cancer Res., 2007, 67(11):11648.
[18] Gergia I T, Kaliopi N M, Gabriel E P, et al. Checkpoint abrogation in G_2 compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(9):11292.

[责任编辑 李玉洁]

intraperitoneally and acute cerebral ischemia induced by broken neck. The best proportion of effective components was calculated by multiple regression equations. **Result:** The best ratio appeared to be 20:15 mg·kg⁻¹, namely, the ratio of 4:3. The proportion could prolong the survival time of mice with acute cerebral ischemia (*P* < 0.05). **Conclusion:** The combination of uniform design and animal models in pharmacodynamics is an effective way to optimize the proportion of Chinese medicinal components.

[**Key words**] *Panax notoginseng*; *Crataeguspinnatifida*; combination of effective components; uniform design

均匀设计是我国科学院应用数学所研究员方开泰教授和中国科学院院士王元,在1980年将数论与实验设计相结合的一种全新的多因素多水平实验设计方法,是我国独创的一种重大的科学实验方法,它有别于正交设计,更适合于多因素、多水平的实验设计,减少了实验次数,实验结果可用计算机处理,通过回归方程选出最佳实验条件^[1-4]。本文用均匀设计方法结合有关的药效学指标进行试验研究,探求药物间的最佳配比,可以很有效的进行中药的复方研究^[5-7]。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,18~22 g,雌雄均用;Wistar大鼠,体重220~250 g,雌性,均由吉林大学基础医学院动物实验中心提供,许可证号SCXK-(吉)-2003-0001。

1.2 药品与试剂 三七,经吉林省中医药科学院中药化学实验室焦连庆研究员鉴定为五加科植物*Panax notoginseng*(Burk.)F. H. Chen.的叶;山楂,经其鉴定为蔷薇科植物*Crataegus pinnatifida* Bge.的叶。三七叶总皂苷、山楂叶总黄酮,由吉林省中医药科学院化学室提供;血塞通胶囊,云南白药集团文山七花有限责任公司,批号20061001;盐酸异丙肾上腺素注射液,上海禾丰制药有限公司,批号030702。

2 方法

2.1 剂量的选择和设计 根据预实验工作拟采用山楂叶总黄酮(SZ)与三七叶总皂苷(SQ)组方,筛选出治疗脑缺血的最佳配比,通过文献报道及我们的前期工作提示,拟定山楂叶总黄酮的有效剂量为200 mg·kg⁻¹(小鼠),三七叶总皂苷的有效剂量为60 mg·kg⁻¹(小鼠)。按照U₆(6⁴)均匀设计表安排试验,剂量和配伍见表1。采用小鼠腹腔注射异丙肾上腺素^[8]和小鼠断头致急性脑缺血两种模型观察药物的作用效果^[9-10]。

2.2 对断头致急性脑缺血小鼠存活时间的影响 取小鼠84只,雌雄各半,随机分为7组:空白组,山楂叶总黄酮:三七叶总皂苷200:15,

表1 均匀设计法的剂量和配比

No.	S ₂ /配比 /mg·kg ⁻¹	SQ/配比 /mg·kg ⁻¹
1	1(200)	3(15)
2	2(100)	6(1.875)
3	3(50)	2(30)
4	4(25)	5(3.75)
5	5(12.5)	1(60)
6	6(6.25)	4(7.5)

100:1.875,50:30,25:3.75,12.5:60,6.25:7.5(mg·kg⁻¹)6个剂量给药组,每日灌胃给药1次,连续5 d,空白组给予同体积蒸馏水20 mL·kg⁻¹。于末次给药后1 h,将小鼠逐只断头,立即按秒表记录小鼠断头后至张口喘气停止时间。

2.3 对腹腔注射异丙肾上腺素小鼠存活时间的影响 取小鼠84只,雌雄各半,随机分为7组:空白组,山楂叶总黄酮:三七叶总皂苷200:15,100:1.875,50:30,25:3.75,12.5:60,6.25:7.5(mg·kg⁻¹)6个剂量给药组,每日灌胃给药1次,连续5 d,空白组给予同体积蒸馏水20 mL·kg⁻¹。末次给药1 h后,于动物腹腔注射异丙肾上腺素18 mg·kg⁻¹,15 min后将动物置于密闭的200 mL广口瓶中,观察动物的存活时间。

2.4 对大鼠体内血栓形成的影响 将山楂叶总黄酮、三七叶总皂苷二者剂量相加得到小鼠灌胃剂量为SS有效部位组合物35,17.5,8.75 mg·kg⁻¹,根据小鼠剂量推算大鼠剂量为SS有效部位组合物为24.5,12.25,6.125 mg·kg⁻¹,进行大鼠确认试验^[12]。取61只大鼠,随机分为5组:空白组,血塞通胶囊42 mg·kg⁻¹剂量给药组,SS有效部位组合物24.5,12.25,6.125 mg·kg⁻¹3个剂量给药组。每日灌胃给药1次,连续7 d,同时空白组给予同体积蒸馏水10 mL·kg⁻¹。末次给药后1 h,用水合氯醛300 mg·kg⁻¹将动物麻醉,背位固定,剥离右颈总动脉和左颈总静脉,在一根长约18 cm的管内,放置长约6

cm 的 4[#] 丝线, 在其内充满 50 u·mL⁻¹ 的肝素, 5 min 后打出肝素并用生理盐水冲洗 1 次, 然后分别从静脉和动脉插管, 形成体外动-静脉回路, 循环 15 min, 取出丝线, 烤箱 60 °C 烘至恒重, 用精密电子天平称重, 计算血栓质量^[13]。

2.5 多元回归处理 将试验配比方案及其对应的试验结果输入计算机, 经计算机多元回归处理, 求得多元回归方程^[11], 见表 2。

表 2 多元回归方程表

指标	回归方程
断头小鼠存活时间	$Y = -0.000 15Xa^2 + 59.082 42Xa - 2.034 2Xb^2 + 55.743 13Xb - 4.014 835XaXb - 354.31$
注射异丙肾上腺素小鼠存活时间	$Y = -0.000 44Xa^2 + 59.082 42Xa - 2.034 2Xb^2 + 55.743 13Xb - 4.014 835XaXb - 354.31$

注: Xa 为山楂叶总黄酮用量; Xb 为三七叶总皂苷用量。

针对腹腔注射异丙肾上腺素小鼠耐缺氧能力的影响结果提示, 当 $Xa = 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $Xb = 7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 预期药效良好。Xa 剂量增倍时, 药效下降较多, 从药效考虑不宜增量。Xa 剂量减半时, 药效下降较少, 从安全考虑可减少剂量。Xb 剂量增倍时, 药效下降较少, 从药效考虑可增加剂量。Xb 剂量减半时, 药效下降较多, 从药效考虑不宜减量。

根据两个试验所得的多元回归方程提示, 故将山楂剂量保持不变, 将三七剂量增加到本实验室以往所得到的最佳剂量 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。设高 (SZ/SQ 为 $80/60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中 (SZ/SQ 为 $40/30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、低 (SZ/SQ 为 $20/15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 3 组进行验证试验。

3 结果

3.1 对断头致急性脑缺血小鼠存活时间的影响

由表 3 结果可见, 与空白组比较, 各给药组均能明显延长动物的死亡时间 ($P < 0.01$)。

试验结果显示, 高、中、低 3 个剂量组均获得较好疗效, 我们重新调整剂量重复上次试验, 以期用最小的给药量获得最大的效果。

表 3 SZ + SQ 不同对比对断头致急性脑缺血小鼠存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	存活时间 /s
空白	-	25.08 ± 2.68
血塞通	60	30.33 ± 3.23 ²⁾
SZ: SQ	80: 60	30.75 ± 2.45 ²⁾
	40: 30	29.42 ± 2.75 ²⁾
	20: 15	29.67 ± 2.02 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对断头致急性脑缺血小鼠存活时间的影响

由表 4 结果可见, 与空白对照组比较, 山楂叶总黄酮

2.6 最佳用量优化 针对断头致急性脑缺血小鼠存活时间的影响结果提示, 当 $Xa = 26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $Xb = 34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 预期药效良好。Xa 剂量增倍时, 药效下降较多, 从药效考虑不宜增量。Xa 剂量减半时, 药效下降较少, 从安全考虑可减少剂量。Xb 剂量增倍时, 药效下降较少, 从药效考虑可增加剂量。Xb 剂量减半时, 药效下降较多, 从药效考虑不宜减量。

: 三七叶总皂苷 20: 15 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组能明显延长动物的存活时间 ($P < 0.01$), 山楂叶总黄酮: 三七叶总皂苷 10: 7.5 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组也能延长其存活时间 ($P < 0.05$)。

表 4 对断头致急性脑缺血小鼠存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	存活时间/s
空白	-	29.67 ± 3.60
血塞通	60	33.83 ± 5.13 ¹⁾
SZ: SQ	20: 15	34.25 ± 1.66 ²⁾
	10: 7.5	33.25 ± 3.28 ¹⁾
	5: 3.75	31.17 ± 2.48

注: 与试验组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对大鼠体内血栓形成的影响 由表 5 结果可见, 与空白对照组比较, 血塞通胶囊给药组, 有效部位组合物高剂量组能明显减轻大鼠体内血栓形成的质量 ($P < 0.05$)。

3.4 比例确定 根据上述试验结果及药物的成本、安全性等多方面因素综合考虑, 确定 SS 有效部位组合物中二药的剂量比山楂叶总黄酮: 三七叶总皂苷为 20: 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (小鼠), 即配比为 4: 3。

表 5 对大鼠体内血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	血栓质量 /mg
空白	-	11	14.92 ± 5.01
血塞通胶囊	42.0	12	9.96 ± 3.28 ¹⁾
SS 有效部位组合物	24.5	12	10.48 ± 3.69 ¹⁾
	12.25	11	11.37 ± 3.75
	6.125	10	13.67 ± 6.07

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

均匀设计法是近年来解决多因素多水平问题较好的方法,能用较少的试验次数完成复杂的科研问题,节省了时间、人力、物力,给科研工作者带来极大的方便。我们在实验中根据药物特点,将两种有效部位提取物设计了6个剂量梯度水平,并结合药理学实验方法设计了小鼠断头后致急性脑缺氧及腹腔注射异丙肾上腺素观察耐缺氧能力两种动物模型,虽有6个剂量水平梯度,却避免了正交设计的大量的实验,并做到了均匀分散,通过试验和计算机统计分析,我们得到了山楂叶总黄酮和三七叶总皂苷的最佳剂量配比为4:3,并通过小鼠和大鼠的验证试验证明其作用效果。为运用统计学中均匀设计与药理学中动物模型相结合的方法研究中药复方起到了示范作用。

[致谢]皖南医学院孙瑞元教授对本课题组大力支持。

[参考文献]

[1] 贺石林. 中医科研设计与统计学[M]. 湖南:湖南科学技术出版社,2001:1.
[2] 郑亚玉. 均匀设计及其在中药民族药研究中的应用[J]. 中国民族医药杂志,2009,8(8):45.
[3] 张瑞涛. 均匀设计法筛选盐酸川芎嗪促透剂组方的最佳配比[J]. 中草药,2007,38(1):50.

[4] 陈向涛. 中药复方药理研究概况[J]. 安徽医药,2002,6(1):3.
[5] 张明. 均匀设计法优先中药免疫复方的试验[J]. 动物医学进展,2010,31(6):38.
[6] 戚晓渊. 杜仲多糖的均匀设计法提取工艺分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):56.
[7] 罗伦才. 均匀设计法用于乳腺增生物模型复制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):204.
[8] 胡小勤. 血瘀证模型研制进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):287.
[9] 孟丽. 均匀设计法考察藜芦对人参的耐缺氧及抗疲劳作用的影响[J]. 实用中医内科杂志,2010,24(2):20.
[10] 边洪荣. 均匀设计黄芪桂枝五物汤不同剂量配比总黄酮含量的比较研究[J]. 中药材,2010,33(2):279.
[11] 曲道炜. 扶正抗癥汤的均匀设计计量筛选[J]. 中华中医药学刊,2009,27(9):1914.
[12] 唐婧姝. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):210.
[13] 池明宇,张成波. 绞股蓝丹对大鼠实验性体内血栓形成的抑制作用研究[J]. 实用中医杂志,2003,19(11):563.

[责任编辑 李玉洁]

《中国中药杂志》2013年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于1955年7月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128页,2013年定价每期30元,全年24期定价为720元。国内刊号11-2272/R,国际刊号1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjcm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询010-64045830转602;主任电话010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。