

# 均匀设计方法在筛选丹皮与薄荷最佳配比中的应用

李卫民<sup>1</sup>, 高英<sup>1</sup>, 陆森和<sup>2</sup>, 谢伟<sup>3</sup>, 陈月娥<sup>1</sup>, 朱贺年<sup>4</sup>, 贾金良<sup>4</sup>

(1 广州中医药大学新药开发研究中心, 广东 广州 510405; 2 广东三水市芦苞卫生院, 广东 南海 528139;  
3 广东深圳三顺制药有限公司, 广东 深圳 518019; 4 内蒙古包头中药厂, 内蒙古 包头 014040)

**摘要:** 应用均匀设计与药效学相结合的方法对丹皮提取物与薄荷油两者的最佳配比进行筛选, 经过数理统计方法确定其两者用量的最佳配比, 为两者的配合应用提供依据。

**关键词:** 均匀设计; 丹皮提取物; 薄荷油

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)03-0026-03

## The Application of Even-Designed Method in Selection of the Best Proportion of Cotex Moutan and Herba Menthae

LI Wei-min<sup>1</sup>, GAO Ying<sup>1</sup>, LU Sen-he<sup>2</sup>, XIE Wei<sup>3</sup>, CHEN Yue-e<sup>1</sup>, ZHU He-nian<sup>4</sup>, JIA Jin-liang<sup>4</sup>

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, 510405, China;  
2. The Hospitalism of Sanshui Lubao, Hainan, 528139, China; 3. Shenzhen Sanshum Pharmaceutical Co. LTD,  
Shenzhen, 518019, China; 4. Inner Mongolian Baotou Chinese Medicine Factory, Baotou, 014040, China)

**Abstract:** We have selected the proportion of traditional Cortex Moutan and Herba Menthae, by even-designed method in pharmacodynamics and defined the best proportion by mathematical statistics. It has provided basis for their proportional use.

**Key words:** even-designed method; Cotex Moutan; Herba Menthae

在中药新药研究开发中,特别是对一个临床有效的处方进行研究时,经常遇到的问题是除了遵循

中医药理论指导配伍使用外,还有什么更客观、可靠的筛选方法和筛选标准呢?本研究以丹皮提取物和薄荷油两味药不同剂量对比对小鼠腹腔毛细血管通

透性的影响作为观察抗炎指标。丹皮酚作为植物来源的小分子化合物,具有毒副作用小,有明显的抗炎、抗变态反应和免疫调节等广泛的生物活性,是个有希望的抗炎免疫治疗剂。从现有研究资料可以看出,对丹皮酚的抗炎免疫药理研究已做了大量工作,确证了丹皮酚具抗菌消炎、抑制 II、III、IV 型变态反应,影响机体免疫功能等作用<sup>[1-2]</sup>。已进行的临床研究结果表明:丹皮提取物与薄荷油相配伍应用有清热解毒、凉血消炎、止痛之功效,可用于口腔溃疡、口舌生疮、牙龈肿痛等症;因此选择用对腹腔毛细血管通透性的影响来筛选两者最佳配伍的指标是较适宜的药效模型。均匀设计是有别于正交设计的实验设计方法,它的特点是实验次数与水平数相等,将有关实验的实验点数均匀分散在实验范围内,减少了多次实验,且实验结果可用计算机处理,通过回归方程得出最佳实验条件,是一种值得推广的实验设计方法<sup>[3]</sup>,对于本实验,可考虑将两个因素的有关实验范围各等分为五个水平,做五次有关的实验即可筛选出最佳条件。

### 1 目的

摸索丹皮提取物与薄荷油最佳剂量配比筛选实验。以药物不同的配比对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响作为观察抗炎的指标,采用均匀设计两因素五水平的实验安排方法来观察丹皮提取物、薄荷油以及两者之间的最佳剂量配伍作用。

### 2 材料

**2.1 药品** 丹皮提取物原料来源为广州清平药材市场,经鉴定毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。(采用超临界萃取方法得到的提取物,得率为 2.0% 左右, HPLC 法测定丹皮酚含量在 70% 以上)和薄荷油(其中 GC 法测定薄荷醇含量在 50% 以上),由包头中药厂提供,临用时以植物油配成所需浓度;阿司匹林片,北京制药厂,批号 8207115,用无菌蒸馏水配成 1% 的浓度。

**2.2 动物** 昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18~22g,由内蒙古大学实验动物中心提供,合格证号 <京动字> 8806135;器械:721B 型分光光度计,上海第三分析仪器厂。

### 3 方法与结果

**3.1 剂量的设计及选择** 采用均匀设计的方法,按  $U_5(5^4)$  安排实验,丹皮提取物和薄荷油各取 5 个剂量。丹皮提取物的剂量折合药典常规给药量为 0.36g/天/人,换算成小鼠约为 56000ug/kg/天,在该剂

量上下以 5.6 的公比选取 5 个剂量。薄荷油的剂量折合药典常规给药量为 0.12ml/天/人,换算成小鼠约为 20ml/kg/天,以 3.16 的公比在该剂量上下选取 5 个剂量。两药剂量及配伍见表 1。

表 1 均匀设计  $U_5(5^4)$  二因素五水平实验表

组别	丹皮提取物		薄荷油	
	剂量(μg/kg)	对数剂量	剂量(μg/kg)	对数剂量
1	316	2.5	31.6	1.5
2	1778	3.25	316	2.5
3	10000	4	10	1
4	56234	4.75	100	2
5	316227	5.5	1000	3

**3.2 操作步骤**<sup>[4]</sup> 取小鼠 100 只,随机分为 10 组,第一组为蒸馏水对照组,第二组为植物油对照组,第三组为阿司匹林组,第四组为丹皮提取物,第五组为薄荷油,第六~十组分别为丹皮提取物与薄荷油不同比例配伍的 1~5 组,各组均采用灌胃给药,0.2ml/10g,一天一次,连续给药 3d。在末次给药后 40min,尾静脉注射 1% 伊文思兰 0.1ml/10g,随即腹腔注射 0.8% 醋酸 0.2ml/只,20min 后脱颈椎处死,剪开腹部,用 10ml 生理盐水冲洗腹腔数次,收集冲洗液并定容至 8ml,离心(3000rpm × 15min)后取上清液用 721B 型分光光度计在 590nm 处测定样品 OD 值。OD 值越大,血管通透性越高。

**3.3 结果** 将实验结果输入计算机,用沈阳药科大学编制的均匀设计软件进行处理分析,得到  $R = 0.7360808$   $Y = 1.2326 - 0.0886X_1 - 0.5284X_2 + 0.1235X_2^2$  理论最佳实验结果为  $0.189(0.1353 \sim 0.2434)$   $X_1 = 5.397$   $X_2 = 2.125$

表 2 药物对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响(n=10)

组别	药物及剂量(对数剂量)	OD 值( $X \pm S$ )
1	蒸馏水	0.9627 ± 0.170
2	植物油	0.614 ± 0.117
3	阿司匹林	0.285 ± 0.094**
4	丹皮提取物 4.75	0.468 ± 0.142***
5	薄荷油 2	0.538 ± 0.181***
6	丹皮提取物 2.5+ 薄荷油 1.5	0.527 ± 0.158
7	丹皮提取物 3.25+ 薄荷油 2.5	0.365 ± 0.163*
8	丹皮提取物 4+ 薄荷油 1	0.458 ± 0.116
9	丹皮提取物 4.75+ 薄荷油 2	0.249 ± 0.163**
10	丹皮提取物 5.5+ 薄荷油 3	0.287 ± 0.191**

与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与第 9 组比较 \*\*\*  $P < 0.01$ 。

表 3 回归方程显著性检验

剩余平方差 $Q=0.0023$	回归方程的显著性检验 $F=7.3117$ $N=5$
标准离差 $S=0.0484$	
复相关系数 $R^2=0.978$	
回归的显著性检验 $ALFA=0.02639$	

从回归方程的显著性检验结果得知:  $F=7.3117 > F_2^5=5.79$  ( $\alpha=0.05$ ), 回归方程式有显著意义。因为 5.397 与 2.125 是对数剂量, 换算后 5.397 为 249459 $\mu$ g/kg, 即 250mg/kg; 2.125 换算后为 133.35 $\mu$ g/kg, 即 0.135ml/kg。结果说明二者相互配比并非是比例越高, 效果越好。理论计算值二者的最佳剂量配比是: (丹皮提取物: 薄荷油 = 250mg/kg: 0.135ml/kg), 因两者的理论最佳剂量之比约为 2:1, 故在实际使用中两者的比例可按 2:1 来计算。

**3.4 筛选结果验证(对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响)** 取小鼠 70 只, 雌雄各半, 体重 18~22g, 随机分为 7 组。每 1 组为模型组, 给予溶剂; 第二组为阳性对照组, 给予西瓜霜; 第 3~7 组为将最佳配比后的药物按不同剂量给药。各组小鼠均灌胃给药, 容量为 0.2ml/10g, 一日一次, 连续 3 日, 操作同上。

结果表明, 给药各组均可明显降低小鼠腹腔毛细血管通透性, 且呈明显的量效关系, 作用强于对照药西瓜霜组。从结果还可看出, 当药物浓增至 150.8mg/kg 和 302.8mg/kg, 其降低血管通透性的作用与 75.4mg/kg 组无明显差异, 故药效实验的最佳有效剂量为 75.4mg/kg(见表 4)。

表 4 最佳比例药物的不同剂量对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响( $\bar{x} \pm s; n=10$ )

组别	剂量(mg/kg)	OD 值
对照组	—	0.47 $\pm$ 0.11
西瓜霜组	2160	0.36 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>
给药组	302.8	0.20 $\pm$ 0.10 <sup>***<math>\Delta</math></sup>
	150.8	0.19 $\pm$ 0.08 <sup>***<math>\Delta</math></sup>
	75.4	0.20 $\pm$ 0.07 <sup>***<math>\Delta</math></sup>
	37.7	0.25 $\pm$ 0.09 <sup>***<math>\Delta</math></sup>
	18.9	0.36 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup>

与西瓜霜相比 <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.01$

#### 4 讨论

小鼠腹腔注射醋酸后, 可使腹腔内毛细血管的通透性增加, 血管内伊文思兰渗入腹腔而使腹腔液

呈兰色; 兰色越深; 比色时 OD 值越大, 表明血管通透性越强, 植物油与蒸馏水组 OD 值无明显差异, 表明以植物油作溶剂对血管通透性没有影响; 直观分析可知单独的丹皮提取物、薄荷油与空白组(植物油与蒸馏水组)相比有一定的作用, 但远远不如相互配伍后作用好 ( $P < 0.01$ ), 说明二者加合后有相互增强药效的作用; 丹皮提取物和薄荷油配伍后各剂量组与对照组比 OD 值有不同程度的下降, 说明丹皮提取物和薄荷油配伍可抑制小鼠腹腔毛细血管的通透性, 具有明显的相互增强抗炎的作用。将最佳配比的药物以不同的剂量给药, 结果证实了最佳配比的给药各组均可明显降低小鼠腹腔毛细血管通透性, 且呈明显的量效关系, 作用强于对照药西瓜霜组。

该实验的设计方是建立于试验点均匀分散的基础之上, 试验点中最优的配伍条件离试验范围内最优的配伍条件不是很远<sup>[3]</sup>, 见图 1, 随着实验次数的增加, 试验范围内的最优的配伍条件就离理论上最优的配伍条件就越接近了。在上述实验结果中以丹皮提取物和薄荷油的对数剂量分别为 4.75 和 2 时 OD 值最小, 抗炎作用最强, 说明试验范围内的最优的配伍条件是丹皮提取物和薄荷油的最佳剂量配比丹皮提取物 4.75: 薄荷油 2。因我们只进行了五次有关的实验, 不能以试验范围内的最优的配伍条件来作为处方, 而应以理论上的最佳配伍条件丹皮提取物 5.397: 薄荷油 2.125 = 250mg/kg; 0.135ml/kg 来确定处方。用均匀设计方法结合有关的药效学模型筛选药物之间的理论最佳配比, 进行相应的研究, 是中药新药开发的一个方向。

#### 参考文献:

- [1] 巫冠中, 抗秉茜, 杭静霞, 等. 丹皮酚的抗炎作用及其机制[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20: 147-150.
- [2] 巫冠中, 杭秉茜, 杭静霞, 等. 丹皮酚的抗变态反应作用[J]. 中国药科大学学报, 1990, 21: 103-106.
- [3] 李卫民, 高英, 刘东辉, 等. 均匀设计方法在厚朴丸中筛选最佳配比的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(2): 18-21.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 356.