

# 基于均匀设计的中药有效组分复方配伍研究

杨鸿 吴彦 马琰岩 吕俊海 李晶哲

**【摘要】 目的** 探索基于均匀设计的中药抗氧化有效组分复方的研究分析方法。**方法** 采用均匀设计和改进最小角回归分析,对甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿总黄酮和黄芪总苷组成的中药组分复方不同配比体外清除 DPPH 自由基的作用进行研究。**结果** 通过分析获得了中药组分配伍清除 DPPH 的回归方程,优化组合后进行药效学验证,结果显示该中药组分配伍最佳剂量组合为甘草总黄酮 0.8 mg/ml、银杏叶提取物 3.144 mg/ml、淫羊藿总黄酮 0.024 mg/ml 和黄芪总苷 0.036 mg/ml。**结论** 上述中药组分配伍后能有效清除 DPPH 自由基;本实验采用的均匀设计结合改进最小角回归分析适合“非线性、小样本”生物实验数据数据分析,为筛选评价抗氧化中药有效组分复方提供了合适的研究方法。

**【关键词】** 中药有效组分配伍; 均匀设计; 改进最小角回归; DPPH

**【中图分类号】** R284.3 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.03.007

**Uniform designed research on the active ingredients assembling of Chinese herbal for antioxidative capacity** YANG Hong, WU Yan, MA Yan-yan, et al. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Science. Beijing 100700, China

Corresponding author: WU Yan, E-mail: wu\_yan2003@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To find a suitable way of quantitative composition-activity relationship of Chinese herbal for antioxidative capacity based on uniform design. **Method** Chinese herbal active ingredient formula was composed of Total flavonoids of Glycyrrhiza (TFG), ginkgo biloba extract (GBE), Total flavonoids of epimedium (TFE) and astragaloside (AST). The herbal efficacy was detected by scavenging the free radical of DPPH in vitro, and the mathematical model was constructed to describe the connection between different combinations and their antioxidative capacity by the method of LARS regression. **Result** The best effect was in the ratio of TFG 0.8 mg/ml, GBE 3.144 mg/ml, TFE 0.024 mg/ml, AST 0.036 mg/ml. **Conclusion** Uniform designed research is one of efficient ways to describe the quantitative composition-activity relationship.

**【Key words】** Active ingredients assembling of Chinese herbal; Uniform design; LARS regression; DPPH

随着中药现代化的发展,中药的配伍组方研究已经从传统的饮片层次上升到组分层次,中药有效组分配伍已经成为中药创新研究的一种新模式<sup>[1]</sup>,创新与延伸了方剂配伍理论。进行组分配伍研究

的关键问题之一,是针对特定临床疾病和药效指标,如何获得各组分的最优剂量效应配比,从而能够定量描述中药组分与药效之间的关系。由于中药成分的复杂性和量效关系的非线性特征,与其相适应的研究优化方法需要具备非线性拟合能力,同时也要注意中药组分配伍研究的高效性、实用性和可靠性。其中均匀设计适合于多因素多水平的实验研究,能够定量分析预测优化结果,在最佳剂量配比的确定方面发挥了较好的作用<sup>[2]</sup>。本文在前期单味中药组分药效研究<sup>[3]</sup>的基础上,结合中医理

作者单位:100700 北京,中国中医科学院医学实验中心

作者简介:杨鸿(1971-),博士,出站博士后,副研究员。研究方向:中医证候的系统生物学研究及中药复方及其配伍的分子机制研究。E-mail:leslie18029@163.com

通讯作者:吴彦(1972-),医学博士,副研究员。研究方向:新药临床前药理学研究。E-mail:wu\_yan2003@hotmail.com

文献标引格式:

杨鸿,吴彦,马琰岩,等.基于均匀设计的中药有效组分复方配伍研究[J].环球中医药,2012,5(3):190-193.

论指导,筛选银杏叶提取物、淫羊藿总黄酮、黄芪总苷和甘草总黄酮组成了中药组分复方,采用均匀设计结合改进最小角回归(Improved least angle regression, Improved LARS)分析,以清除 DPPH 自由基能力为药效评价指标,按照均匀试验设计——药效试验——数学建模及模型验证评价程序,进行了抗氧化中药有效组分复方筛选评价的方法学研究探索,为探索适合中药组效关系的研究方法提供研究依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及受试药品

DPPH,美国 SIGMA 公司产品,批号 S90790 - 379;无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司,分析纯,批号:20091216。甘草总黄酮,规格 90%,批号 091015;银杏叶提取物,规格 24% 黄酮和 6% 内酯,批号 091015;淫羊藿总黄酮,规格 70%,批号 091108;黄芪总苷,规格 50%,批号 091015;均为南京朗泽医药科技有限公司产品。

### 1.2 仪器设备与软件工具

DU730 型蛋白核酸分析仪,美国 BECKMAN 公司产品;BT25S 十万分之一电子分析天平,德国 Sartorius 公司产品。

“组分优化软件 v1.0”由中国中医科学院杨洪军老师提供。

### 1.3 均匀设计实验方案

按照水平数应大于因素数 2 倍的均匀设计原则,本实验设计为 4 因素 12 水平,采用均匀设计方案  $U_{12}(12^4)$  表进行剂量配比关系研究;4 种中药有效组分甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿总黄酮和黄芪总苷作为考察因子,根据实际需要,甘草总黄酮和银杏叶提取物设计为 12 个剂量水平;淫羊藿总黄酮和黄芪总苷由于受限于剂量范围较小,采用拟水平方式,设计 6 个剂量水平,循环一次达到 12 个水平。均匀试验安排见表 1。

### 1.4 中药组分配伍清除 DPPH 自由基的测定方法<sup>[4]</sup>

DPPH 自由基清除实验是判定药物体外抗氧化活性的经典实验方法,具有灵敏度高,重复性好,误差较小等特点,具体方法如下:

将 DPPH 用无水乙醇配置成浓度为 25 mg/L 备用。配置各实验编组药物浓度,使反应体系药物总浓度恒定为 0.05 mg/ml。在试管中依次加入 2 ml

DPPH 溶液和 0.5 ml 70% 醇溶液(样品溶解溶剂),混匀后用 1 cm 比色皿在 517 nm 波长处测吸光值(A),记为  $A_0$ ;加入 2 ml DPPH 溶液和 0.5 ml 待测中药组分复方试液,混匀后在黑暗处静置 30 分钟,测定记为  $A_i$ ;加入 2 ml 无水乙醇溶液和 0.5 ml 待测中药组分复方试液,混匀后测定值,记为  $A_j$ ,按下式计算自由基清除率。清除率(%) =  $[1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$ 。进行三次重复实验,清除率采用“均数 ± 标准差”表示。

表 1  $U_{12}(12^4)$  均匀试验设计表

试验编号	因素			
	甘草总黄酮(mg/ml)	银杏叶提取物(mg/ml)	淫羊藿总黄酮(mg/ml)	黄芪总苷(mg/ml)
1	0.450	1.350	0.36	0.81
2	0.675	2.700	0.54	0.27
3	0.900	1.125	0.90	0.81
4	1.125	2.475	1.08	0.27
5	1.350	0.900	0.18	0.99
6	1.575	2.250	0.54	0.45
7	1.800	0.675	0.72	0.99
8	2.025	2.025	1.08	0.45
9	2.250	0.450	0.18	1.17
10	2.475	1.800	0.36	0.63
11	2.700	0.225	0.72	1.17
12	2.925	1.575	0.90	0.63

### 1.5 LARS 回归分析、多元线性回归分析及中药组分复方剂量配比优化结果验证

根据实验结果,分别采用 Improved LARS 分析方法、多元线性回归分析方法,通过“组分优化软件”,获得四组分配伍清除 DPPH 的回归方程,结合实际进行人工优化,获得优化配伍结果,按照 2.2 方法再次进行优化配伍测试和验证,获得清除 DPPH 的最优配比,通过比较分析两种回归方法的差异。

## 2 结果

### 2.1 中药有效组分配伍对 DPPH 自由基的清除作用

根据均匀设计和实验检测方法,四味中药有效组分不同配比组合对 DPPH 自由基均有一定的清除作用,其中实验 2 为实际清除 DPPH 效果最好的组合。实验结果详见表 2。

表 2 中药组分均匀实验配伍组合对 DPPH 清除率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

实验组合序号	DPPH 清除率(%)
实验 1	58.841 ± 1.383
实验 2	71.208 ± 1.590
实验 3	45.217 ± 0.547
实验 4	62.101 ± 0.435
实验 5	51.715 ± 0.514
实验 6	64.324 ± 0.711
实验 7	46.184 ± 0.209
实验 8	59.541 ± 1.048
实验 9	49.324 ± 0.302
实验 10	62.609 ± 0.261
实验 11	44.251 ± 1.653
实验 12	56.546 ± 0.254

## 2.2 均匀试验结果的回归分析

根据表 2 的实验结果,采用 Improved LARS 和多元线性回归分析分别获得四组分配伍清除 DPPH 的回归方程,其中甘草总黄酮为 X1,银杏叶提取物为 X2,淫羊藿总黄酮为 X3,黄芪总苷为 X4,平均清除率为 Y;从所建立的成分组合与药效间的 Improved LARS 数学模型中看出,在清除 DPPH 自由基方面既有各有效组分的单独作用,也有它们两两之间的交互作用,既可“增效”也有“拮抗”作用,能够显示出中药多组分配伍的复杂性和非线性;而线性回归方程仅显示了各单个组分的作用,而没有反应出组分间的交互影响。回归方程如下:

(1) 中药组分配伍清除 DPPH 的 LRAS 回归方程

$$Y = (1348.41024529341) \times X1 \\ + (1902.85081030458) \times X2 \\ + (0.432341713582079) \times X3$$

$$+ (-20.861132023621) \times X4 \\ + (-11511.5692665415) \times X1 \times X2 \\ + (6495.11575739643) \times X1 \times X3 \\ + (18840.5788500999) \times X2 \times X4 \\ + (1287.76729516979) \times X1 \times X1$$

(2) 中药组分配伍清除 DPPH 的多元线性回归方程

$$Y = (-1371.24900228961) \\ + (28648.4949869476) \times X1 \\ + (29276.1810839307) \times X2 \\ + (27530.7710541729) \times X3 \\ + (27748.8885934949) \times X4$$

## 2.3 优化配伍结果及其验证实验

根据以上回归方程并结合实际进行人工优化,获得该中药有效组分复方的 2 个优化配伍预测组合,同时为了验证预测的准确性设计了另两个配伍组合。将这四个组合和实际检测最佳组合进行了清除 DPPH 的验证实验,结果显示清除 DPPH 效果以预测 A 组合为最优(甘草总黄酮 0.8 mg/ml、银杏叶提取物 3.144 mg/ml、淫羊藿总黄酮 0.024 mg/ml 和黄芪总苷 0.036 mg/ml),不仅优于均匀设计实际检测最佳组合的清除作用,同时也要强于其组成各单味组分中药的作用;实验结果与通过 Improved - LARS 和多元线性分析获得的预测趋势是一致的,在预测结果方面显示两种分析方法差别不大,然而从 Improved LARS 数学模型中能够显示出中药多组分配伍的复杂性和非线性,而线性回归模型则反应不出各组分间的相互作用。因此综合看来,依据 Improved LARS 算法所建立的数学模型对中药组分配伍来说更为适合。实验结果见表 3。

表 3 中药组分优化组合清除 DPPH 的预测和验证结果

实验组合序号	甘草总黄酮 (mg/ml)	银杏叶提取物 (mg/ml)	淫羊藿总黄酮 (mg/ml)	黄芪总苷 (mg/ml)	LRAS 回归预测 清除率(%)	多元线性回归方程 预测清除率(%)	验证清除率(%)
实验 2(DPPH 实际最佳)	0.645	2.581	0.516	0.258	71.581	71.339	84.127
实验 A(优化组合预测最佳)	0.800	3.144	0.024	0.036	84.214	86.536	90.716
实验 B(优化组合预测次佳)	0.800	2.984	0.116	0.104	81.277	83.231	88.996
实验 C(组合)	3.144	0.800	0.024	0.036	69.638	68.145	82.701
实验 D(组合)	2.984	0.800	0.116	0.104	67.392	66.095	80.946
实验 E(A-甘草总黄酮)	0.800	0	0	0			22.596
实验 F(A-银杏叶提取物)	0	3.144	0	0			85.837
实验 G(A-淫羊藿总黄酮)	0	0	0.024	0			1.664
实验 H(A-黄芪总苷)	0	0	0	0.036			0.165

注:上述剂量为原始药物配置浓度

文献标引格式:

杨鸿,吴彦,马琰岩,等.基于均匀设计的中药有效组分复方配伍研究[J].环球中医药,2012,5(3):190-193.

### 3 讨论与结论

在中药有效组分复方的配伍研究中,用于定量描述中药组分与药理效应之间关系时,需要借助适宜的数学分析建模方法。目前,常用的中药组分配伍优选设计方法有正交设计、均匀设计、基线等比增减设计、配伍计量分析法、药对协同效应设计、极性分段筛选设计等<sup>[5-8]</sup>,各有特点:如正交设计具有试验点分布均衡、整齐可比,但实验次数较多等特点;基线等比增减设计、配伍计量分析法和药对协同效应设计适合于两种药物的配比优化研究;极性分段筛选设计则适合于药物极性有明显差别的复方组分筛选。而针对目前日益增多的中药有效部位和单体组分,该如何选择合适的研究方法,切实有效的进行多组分中药复方的配伍研究则日益迫切。本研究显示均匀设计可以在最佳剂量配比确定方面发挥较好的作用,其优点在于适合多因素、多水平的实验研究。在同等情况下,不仅试验次数较正交设计大为减少,而且通过分析处理试验数据,能够定量分析各因素对试验结果的影响,定量地预报优化条件及优化结果的区间估计。所采用的 Improved LARS 回归数据分析方法,属于一种非线性多元回归算法,符合中药复方量效关系研究中的非线性特征,对于偏差较大的数据依然能够给出良好的拟合能力,符合生物实验数据离散度较大的特点,适合“非线性、小样本”的中药多组分与生物效应间数据分析和关系描述。

本次研究根据均匀设计原理获得了 12 组中药组分不同配比的 DPPH 清除率数据,依据 Improved LARS 进行了数学分析建模,获得了优化组合的预测清除率,验证结果显示最佳组合不仅优于均匀设计中实际检测最佳组合的清除作用,同时也要强于其组成各单味组分中药的作用。由于生物实验自身的离散度等原因,不同批次实验数据会有波动,但不同组合优劣排序与预测排序结果是一致

的,说明该方法适合生物数据的分析,具有良好的预测性,用于中药组分配比筛选是可行的。同时,在运用均匀设计进行组分配伍研究时需要注意以下问题:

(1) 恒定配比药物反应总量:由于在剂量配比研究中存在量效关系的干扰,因此在使用均匀设计表安排配比实验时需要排除这种影响,通过恒定每个组合在药效反应体系中的总量,可以保证结果的客观性和准确性。

(2) 药效评价指标的选择:在效应评价过程中应选择特异性高、生物离散度较低、重复性较好的定量指标,这样获得的回归方程拟合性较好,预测最佳剂量配比准确度高。

(3) 中药作用具有多成分、多靶点特性,有效组分复方的总效应也非单一组分单独作用的线性叠加,而是既可“增效”也可“拮抗”,显示出配伍研究的复杂性和非线性特征。

### 参 考 文 献

- [1] 张伯礼,王永炎. 方剂关键科学问题的基础研究——以组分配伍研制现代中药[J]. 中国天然药物,2005,3(5):258-261.
- [2] 曾昭钧. 均匀设计及其应用[M]. 沈阳:辽宁人民出版社,1994:5.
- [3] 吴彦,杨鸿,刘红,等. 中药组分清除烟气有害物质及降低细胞毒性的研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(22):3184-3188.
- [4] 勾明玥,刘梁,张春枝. 采用 DPPH 法测定 26 种植物的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业杂志,2010,36(3):148-150.
- [5] 闫润红. 正交设计法在中药配伍研究中的应用[J]. 山西中医学院学报,2000,1(1):33-35.
- [6] 商洪才,张伯礼,王永炎,等. 一种适用于中药小复方配比优选设计方法的建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(3):1-3.
- [7] 周永梅,周曾同. 中药单方和复方对人类癌细胞株体外抑制作用研究[J]. 临床口腔医学杂志,2008,24(1):3-5.
- [8] 梁日欣,黄璐琦,刘菊福,等. 药对川芎和赤芍对高脂血症大鼠降脂、抗氧化及血管内皮功能的实验观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(1):43-45.

(收稿日期:2011-12-27)

(本文编辑:秦楠)