

基于均匀设计法对酸枣仁镇静催眠有效组分的配伍研究

李 陆, 刘桂友, 刘婧姝, 杨 奕, 任利妍, 乔 卫*

天津医科大学药学院, 天津 300070

摘要: 目的 优选酸枣仁中 3 种具有镇静催眠作用的主要有效组分(总皂苷、总黄酮、总生物碱)最佳配伍。方法 采用均匀设计法将 70 只小鼠随机分为 7 组, 分别为对照组及给药 A~F 组, 观察各组小鼠自主活动情况; 采用阈上剂量戊巴比妥钠(45 mg/kg)协同睡眠试验, 以小鼠的睡眠潜伏期和睡眠时间为评价指标, 筛选酸枣仁镇静催眠有效组分的最佳配伍。对所得有效组分最佳配伍的药效进行比较和验证实验。**结果** 与对照组比较, 给药 A、C、E 组小鼠自主活动减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), C、D 组小鼠站立次数略有减少 ($P < 0.05$)。在阈上剂量戊巴比妥钠协同试验中, 给药组 C~F 睡眠潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$), B~F 组睡眠时间显著延长 ($P < 0.01$)。经多元统计分析, 酸枣仁镇静催眠有效组分的最佳配伍组合为总皂苷 200 mg/kg、总黄酮 0 mg/kg、总生物碱 20 mg/kg。**结论** 应用均匀设计与药效学相结合确定中药有效组分配伍的方法是可行的。验证实验表明, 酸枣仁有效组分的最佳配伍组合可以达到与原药材相同的疗效。

关键词: 酸枣仁; 皂苷; 黄酮; 生物碱; 均匀设计; 镇静催眠

中图分类号: R283.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1374-04

Optimized compatibility of sedative-hypnotic components in *Ziziphi Spinosae Semen* by uniform design

LI Lu, LIU Gui-you, LIU Jing-shu, YANG Yi, REN Li-yan, QIAO Wei

College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To optimize the compatibility of three sedative-hypnotic components (such as saponin, flavone, and alkaloid) in *Ziziphi Spinosae Semen*. **Methods** Seventy mice were divided into seven (control and experimental A—F) groups by uniform design, and their autonomic activities and synergistic effect were observed. After ip administration of pentobarbital sodium above threshold dose (45 mg/kg), taking sleep latency and sleep duration of mice as evaluating indicators, the best compatibility was screened. Then a further experiment for comparing and verifying the efficacy of the best compatibility was conducted. **Results** Compared with the control group, autonomic activities of mice in experimental group A, C, and E were reduced ($P < 0.05$, 0.01), and time of standing in groups C and D was slightly reduced ($P < 0.05$). In the synergistic effect of pentobarbital sodium above threshold dose, sleep latency in experimental groups C—F was remarkably shortened ($P < 0.01$) and sleep duration in experimental groups B—F was prominently prolonged ($P < 0.01$). The results of multiple regression analysis showed that the optimized ratio of sedative and hypnotic active components in *Ziziphi Spinosae Semen* was saponin 200 mg/kg, flavone 0 mg/kg, and alkaloid 20 mg/kg. **Conclusion** It is feasible to screen the compatibility ratio by combining uniform design with pharmacodynamics. The verification experiment indicates that the sedative and hypnotic effect of the optimized compatibility components are the same as *Ziziphi Spinosae Semen*'s.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*; saponin; flavone; alkaloid; uniform design; sedative and hypnotic activities

酸枣仁味甘、酸, 性平, 归心、肝、胆经。有养心益肝、安神、敛汗之功效, 是治疗心肝血虚之心悸、失眠的要药^[1]。过去曾认为皂苷是酸枣仁的主要有效成分, 而现代药理研究表明, 酸枣仁的镇

静催眠有效成分包括三萜皂苷、黄酮、生物碱类^[2-4]。本课题组受中药小复方协同发挥药效启发, 采用均匀设计法对酸枣仁中 3 种具有镇静催眠作用的主要成分进行配伍研究, 以筛选酸枣仁镇静催眠有效组

收稿日期: 2010-09-14

基金项目: 天津市卫生局科研基金项目(02020)

作者简介: 李 陆(1985—), 女, 天津人, 天津医科大学硕士生, 主要从事天然药物活性成分提取及其药理研究。

Tel: 13512913638 E-mail: xuemeizi1985@hotmail.com

*通讯作者 乔 卫 Tel: (022)23529181 E-mail: qiaowei@tjmu.edu.cn

分的最佳配伍。

1 材料

1.1 动物

雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 体质量 (20±2) g, 购于中国医学科学院中国协和医科大学实验动物研究所, 合格证号: SCXK (京) 2009-0004。实验前在实验室饲养 3 d。室温 (22±2) °C, 相对湿度 65%~70%。光照 12 h, 自由摄食、饮水。

1.2 药品与试剂

酸枣仁 (安国市祁瑞中药材有限责任公司, 批号 090911, 经天津医科大学生药教研室周晔教授鉴定), 自行提取, 分离得到总皂苷、总黄酮及总生物碱提取物 (分别含总皂苷 66.17%, 总黄酮 80.50%, 总生物碱 65.23%) 备用; 戊巴比妥钠 (广州化学试剂厂, 批号 090601); 解郁安神颗粒 (吉林百姓堂药业有限公司, 批号 20100103075)。

1.3 仪器

BP211D 十万分之一分析天平, 上海君达仪器厂; zz-6 小鼠自主活动测试仪, 成都泰盟科技有限公司。

2 方法

2.1 分组与给药

将提取的酸枣仁总生物碱、总黄酮、总皂苷 3 种镇静催眠的有效组分作为考察因素, 每个因素各设 6 个水平 (表 1), 按均匀设计表 $U_6^*(6^4)$ 及其使用表进行安排, 共得 6 种组方, 其具体配伍见表 2。以文献报道^[4-6]的有效剂量为依据, 分别确定剂量范围为总生物碱 5~20 mg/kg、总黄酮 10~50 mg/kg、总皂苷 20~200 mg/kg。由于本课题组前期研究已确定酸枣仁总生物碱具有明显的镇静催眠作用^[3], 为进一步考察总黄酮、总皂苷与总生物碱是否存在镇静催眠的协同作用, 故将总黄酮和总皂苷的初始剂量设为 0 mg/kg。

ICR 小鼠 80 只, 随机分为 8 组, 每组 10 只, 按表 2 设计的剂量 ig 给药, 同时设对照组和解郁安神颗粒 (1.25 g/kg) 阳性对照组, 给药体积为 10 mL/g, 每日 1 次, 连续给药 6 d。

2.2 不同配伍的酸枣仁有效组分药效学评价

2.2.1 小鼠自主活动试验 各组小鼠于给药第 5 天后 0.5 h, 按标号顺序分别单独放入隔音箱内, 以自主活动测试仪自行记录其活动情况。每只小鼠均先在自主活动仪中适应 4 min, 记录随后 5 min 内小鼠自主活动及站立次数。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	总生物碱/(mg·kg ⁻¹)	总黄酮/(mg·kg ⁻¹)	总皂苷/(mg·kg ⁻¹)
1	5	0	0
2	8	10	20
3	11	20	65
4	14	30	110
5	17	40	155
6	20	50	200

表 2 给药方案

Table 2 Schema of dosing

组别	总生物碱/(mg·kg ⁻¹)	总黄酮/(mg·kg ⁻¹)	总皂苷/(mg·kg ⁻¹)
A	5	10	65
B	8	30	200
C	11	50	20
D	14	0	155
E	17	20	0
F	20	40	110

2.2.2 阈上剂量戊巴比妥钠协同试验 各组小鼠于给药第 6 天, ig 给药 0.5 h 后 ip 给予阈上剂量 (45 mg/kg) 戊巴比妥钠。注射后开始计时, 记录睡眠潜伏期及睡眠时间。以翻正反射消失时为睡眠起始时间, 翻正反射恢复为睡眠结束时间。ip 给药后至睡眠起始这段时间为睡眠潜伏期, 潜伏期超过 15 min, 按 15 min 记录。

2.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由 SPSS v16.0 软件处理, 采用单因素方差分析法进行统计学分析。

3 结果

3.1 对小鼠自主活动的影响

结果见表 3, 给药 A、C、E 组小鼠自主活动次数与对照组比较, 略有减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。给药 D、E 组站立次数与对照组比较稍有减少, 差异存在统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.2 与阈上剂量戊巴比妥钠镇静催眠的协同作用

结果见表 4, 给药 C~F 组小鼠睡眠潜伏期明显缩短, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。给药 B~F 组睡眠时间与对照组比较明显延长, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。

3.3 数据的统计处理

因中医常将酸枣仁作为养心安神药用于虚烦不眠、惊悸多梦等症, 故在数据多元统计分析时以催眠试验中睡眠时间为主要筛选指标; 由于实验动物

表 3 酸枣仁有效部位不同配伍对小鼠自主活动的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of components in *Ziziphi Spinosae Semen* at various compatibility on autonomic activities in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	活动次数	站立次数
对照	18.29 ± 4.31	56.43 ± 11.90
A	13.00 ± 5.33*	52.92 ± 20.01
B	13.60 ± 5.87	42.25 ± 26.16
C	12.91 ± 4.83*	39.78 ± 18.89
D	15.13 ± 3.31	36.25 ± 8.24*
E	10.89 ± 4.88**	37.25 ± 11.83*
F	16.00 ± 5.83	39.25 ± 14.54
解郁安神颗粒	16.00 ± 5.12	46.70 ± 20.34

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 4 酸枣仁有效部位不同配伍与阈上剂量戊巴比妥钠镇静催眠的协同作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Synergistic effect of pentobarbital sodium above threshold dose with active components in *Ziziphi Spinosae Semen* at various compatibility on sedative and hypnotic activities ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	睡眠潜伏期/s	睡眠时间/min
对照	812.40 ± 148.78	8.90 ± 12.03
A	820.08 ± 158.07	17.08 ± 24.84
B	690.75 ± 249.99	36.50 ± 26.61**
C	562.83 ± 166.32**	36.42 ± 21.26**
D	511.91 ± 202.11**	38.54 ± 25.56**
E	587.91 ± 164.39**	30.18 ± 11.11**
F	539.00 ± 153.20**	36.45 ± 22.84**
解郁安神颗粒	763.31 ± 151.24	31.10 ± 13.25**

与对照组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group

个体差异及实验环境等因素对自主活动结果的影响较大, 可使实验数据离散性变大, 实验结果的相关性差, 所以在统计处理时将小鼠自主活动时间作为辅助指标。

经二次多项式逐步回归法对小鼠阈上剂量戊巴比妥钠睡眠时间实验数据进行处理, 得到镇静催眠药效 (Y) 与酸枣仁有效组分配伍之间的关系方程为 $Y = 8.8909 + 1.6303 X_1 - 0.0174 X_3 + 0.0109 X_2^2 + 0.0004 X_3^2 - 0.0317 X_1 X_2$ (X_1 为生物碱, X_2 为黄酮, X_3 为皂苷), 方程调整后 $r = 1.0000$, $F = 99999.8500$, $P = 0.0024$, $D-W$ 统计量 $d = 2.4046$ 。此方程中各因素最优组合为 $X_1 = 20$, $X_2 = 0$, $X_3 = 200$ 。

3.4 酸枣仁镇静催眠优化方验证试验

ICR 小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只。分别为对照组、阳性对照组 (解郁安神颗粒 1.25 g/kg)、酸枣仁镇静催眠优化方组 (即总皂苷 200 mg/kg + 总生物碱 20 mg/kg) 和酸枣仁药材组 (生药 794 mg/kg)。连续给药 6 d, 用阈上剂量戊巴比妥钠协同试验作为药效学评价指标。结果见表 5, 镇静催眠优化方组睡眠潜伏期及睡眠时间与对照组相比, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。与酸枣仁药材组相比, 睡眠潜伏期明显缩短, 睡眠时间明显延长, 其镇静催眠作用优于药材组, 表明该优化组分有良好的镇静催眠效果。

表 5 酸枣仁镇静催眠优化方验证试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 5 Verification test of sedative and hypnotic activities optimized compatibility of *Ziziphi Spinosae Semen* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	睡眠潜伏期/s	睡眠时间/min
对照	691.83 ± 228.25	17.00 ± 8.77
解郁安神颗粒	632.50 ± 189.59	30.22 ± 12.44
镇静催眠优化方	431.40 ± 122.11**	39.73 ± 17.91**
酸枣仁药材	570.11 ± 173.17	36.89 ± 15.59*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

本研究所用酸枣仁总皂苷、总黄酮及总生物碱提取方法是根据此 3 种有效部位的酸碱性及极性差异建立的一种系统提取分离法。分别利用酸提碱沉法、特异性大孔吸附树脂 (AB-8、X-5) 及聚酰胺树脂分离纯化各部位。再通过各部位 TLC 检定, 未见其余成分的显色斑点。并根据各部位建立的定量测定方法进行检测^[7-8], 质量分数在 50% 以上才符合有效部位提取物标准。

本研究以中医药理论为指导, 受中药小复方中各味药物协同发挥药效思想的启发, 首次采用均匀设计方法对酸枣仁中 3 种主要有效组分最佳配伍进行研究。相比传统的正交设计法, 均匀设计在条件范围变化大而需要进行多水平实验的情况下, 可减少实验次数, 只需要与因素水平数相等次数的实验即可达到正交设计的实验效果^[9-11]。

本研究所筛选优选组分的作用是镇静催眠, 所以进行优化时综合考虑了这两方面的效果。通过小鼠自主活动及阈上剂量戊巴比妥钠协同作用实验, 考察小鼠活动次数、站立次数、睡眠潜伏期及睡眠

时间等几个灵敏而简便的药效学指标,以评价是否具有镇静催眠作用及其作用大小。将药效学与均匀设计法相结合,应用到中药有效组分配伍筛选工作中。实验结果表明,酸枣仁各有效成分组合均有不同程度的镇静催眠效果。运用相关软件分析,得出回归方程,可观察到各组分对作用效果的贡献大小及优化用量的信息。为使配伍更为精确,未选择试验点中最优的配伍,而是以理论上的最佳配伍条件来确定组合。统计分析及验证实验结果证明总皂苷和总生物碱是酸枣仁发挥镇静催眠药效的有效组分,其组合后的药效优于药材组,从而表明以均匀设计与药效学相结合确定中药有效组分配伍的方法是可行的。

参考文献

- [1] 程晓卫,张须学. 酸枣仁功用古今谈 [J]. 中医药管理杂志, 2006, 11(14): 66-68.
- [2] 吴玉兰,许惠琴,陈 洗. 酸枣仁不同炮制品及炒酸枣仁中总黄酮与总皂苷的镇静催眠作用比较 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 868-869.
- [3] 符敬伟,乔 卫,陈朝晖. 酸枣仁总生物碱镇静催眠作用的实验研究 [J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(1): 52-54.
- [4] 王建忠,陈小兵,叶利明. 酸枣仁化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1534-1536.
- [5] Matsuda H, Murakami T, Ikebata A, *et al.* Bioactive saponins and glycosides XIV. Structure elucidation and immunological adjuvant activity of novel protojubenin type triterpene bisdesmosides, protojubosides A, B, and B₁, from the seeds of *Zizyphus jujuba* var. *spinosa* (*Ziziphi Spinosi Semen*) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47(12): 1744-1748.
- [6] 郑 晔,钱苏瑜,游自立. 酸枣仁药理作用研究进展 [J]. 四川生理科学杂志, 2006, 28(1): 35-37.
- [7] 梁柱华,杨建设,杨艺虹,等. 酸枣仁中总黄酮的含量测定研究 [J]. 分析测试技术与仪器, 2008, 14(1): 34-37.
- [8] 高声传,郭 涛,夏维杰,等. 比色法测定酸枣仁提取物中总皂苷的含量 [J]. 实用药物与临床, 2005, 8(1): 15-16.
- [9] 孙晓英,吴 莹,徐庆辉. 均匀设计及其在中药学领域中的应用 [J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 822-824.
- [10] 徐培平,张奉学,符林春,等. 基于均匀设计-偏最小二乘回归建模的中药复方配伍规律研究方法 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 819-824.
- [11] 余日跃,吴兴华,何 雁,等. 正交和均匀设计对四物汤配伍体外抗 LPO 作用比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(3): 46-47.

全国毒性中药饮片学术研讨会征文通知

中华中医药学会医院药房管理分会等单位拟于2011年10月下旬在广东省中山市举办“全国毒性中药饮片学术研讨会”,同时举办国家级继续教育项目“毒性中药饮片研究现状与使用管理培训班”。现向全国征集论文,包括毒性中药饮片生产、经营、使用及监管过程中存在的问题探讨;毒性中药饮片生产炮制加工方法、质量标准及鉴别方法、临床应用经验及中毒病例分析探讨;毒性中药饮片的采购、贮存和使用管理探讨;毒性中药理论、品种划分、用法用量探讨及其他有关毒性中药研究与探讨的文章。

论文请于2011年9月30日前发至E-mail: meiquanxi@163.com。本次会议是一次全面深入探讨毒性中药饮片生产、经营、使用、监管等方面问题的全国性学术研讨会,欢迎投稿。同时也欢迎无论文者参会,参会者可同时获得I类学分12分和II类学分6分。欢迎中药饮片生产、经营单位参与协办会议。

联系地址:广东省中山市西区康欣路3号 广州中医药大学附属中山医院(528400)

联系人:梅全喜

电 话:0760-89980306 13802668925