

正交和均匀设计对四物汤配伍体外抗 LPO 作用比较

余日跃¹, 吴兴华², 何 雁¹, 庄进平³, 陈 奇¹

(1. 江西中医学院, 江西 南昌 330006; 2. 江西省统计局, 江西 南昌 330046;
3. 承德中药厂, 河北 承德 067000)

摘要: 目的: 比较正交设计和均匀设计研究中医方剂配伍规律的实验结果。方法: 选用试验次数相当的正交和均匀设计表及变异系数较小的体外实验方法, 研究四物汤抗 LPO 作用的配伍规律。结果: 两种试验设计的回归方程及相关参数基本一致且显著相关。

关键词: 均匀设计; 正交设计; 四物汤; 过氧化脂质

中图分类号: R284. 2, R285. 5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004) 03-0046-02

在研究中医方剂配伍规律的试验设计中, 目前采用较多的是正交试验设计(orthogonal design, OD)方法, 一方面是因为该法具有整齐可比的特性, 每一考察因素的各个水平与其它待考察因素的各水平间有配伍, 试验设计非常周全; 另一方面是因为该法对试验结果有一套简单易行的计算方法。均匀试验设计(uniform design, UD)在中医药的工艺研究中应用较多, 但在中医方剂配伍实验研究中却很少见。本文拟平行采用这两种试验设计方法, 对四物汤体外抗大鼠肝过氧化脂质(LPO)作用进行拆方分析, 以比较两种试验设计的回归方程及相关参数的一致性。

1 材料

1.1 动物 250~300g SD 雄性大鼠, 由江西医学实验动物中心提供。

1.2 药物 当归(*Angelica sinensis* Diels.)、川芎(*Ligusticum wallichii* Franch.)、白芍(*Paeonia lactiflora* Pall.)、熟地(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)均购自本院中医系药房, 由本院中药鉴定教研室鉴定。取上述药材各 200g, 分别以 1000ml 蒸馏水浸泡 2h, 煮沸半小时过滤, 同法再煮一次, 合并两次滤液, 于水浴上浓缩成 200% 的浓度。加 95% 乙醇至含乙醇 75% 浓度, 搅拌, 次日过滤, 滤液于水浴蒸发乙醇, 浓缩至含生药 250%, 贮冰箱备用。

2 方法和结果

按文献^[2]方法, 取 250g 雄性大鼠, 断头处死, 取

了肝脏, 吸去残血, 将肝剪成碎块, 用生理盐水配成 10% 匀浆, 取新鲜匀浆 1.5ml 加入离心管内。取待试液 0.1ml, 于 37℃ 振荡温育 1.5h, 取出后加入 20% 的三氯醋酸 1.5ml。混匀后静置 10min, 3000rpm 离心 10min, 取上清 1.5ml, 加 0.7% 硫代巴比妥酸 1ml, 沸水浴加热 10min。另设空白对照以生理盐水代替硫代巴比妥酸调零。冷却后在 721 分光光度计 532nm 比色测定大鼠肝 LPO 含量。按下列公式计算各组药物降 LPO 的百分率。

$$\text{降低率} = \frac{\text{对照组光密度均值} - \text{实验组光密度}}{\text{对照组光密度均值}} \times 100\%$$

2.1 UD 实验 以四物汤各组成药白芍(A)、川芎(B)、当归(C)和熟地(D)作为考察因子, 每因子取五水平, 各因子的水平均取: 20、10、5、2.5 和 1.25(mg/ml), 虽然这些水平呈对倍稀释规律, 但若对其取自然对数则得, 2.9957, 2.3025, 1.6094, 0.9163, 0.2231 仍为等差分布, 不失均匀特性。

取 UD 表 $U_{11}(11^4)$, 根据 UD 法规则^[1], 划去最后一行, 取第 1、2、5、7 列安排各因子和水平, 得到表 1 的实验方案, 混合各组药液并加水至 47.5ml, 得 10 种四物汤配方, 第 11 组为生理盐水对照组, 以生理盐水代药。每种配方平行做 2 管, 结果见表 1。

2.2 OD 实验 取实验数与 UD 基本相等的正交表 $L_{12}(2^8)$ 安排各因子, 每因子仅取二水平, 分别为 20 和 1.25(mg/ml), 共得 12 种四物汤配方。与 UD 相同也设一生理盐水对照组, 以上各组平行做 2 管, 结果见表 2。

表 1 均匀设计因子水平安排表

组别	白芍	川芎	当归	熟地	光密度	光密度	降低率	降低率	Y
	A	B	C	D	1	2	Y ₁	Y ₂	
1	20.00	20.00	5.00	2.50	0.101	0.104	86.96	86.57	85.87
2	20.00	10.00	1.25	10.00	0.173	0.193	77.66	75.08	80.93
3	10.00	5.00	10.00	1.25	0.297	0.214	61.65	72.37	65.15
4	10.00	2.50	1.25	5.00	0.302	0.306	61.01	60.49	60.21
5	5.00	1.25	10.00	20.00	0.324	0.329	58.17	57.52	44.42
6	5.00	20.00	2.50	1.25	0.127	0.427	64.23	64.23	64.18
7	2.50	10.00	20.00	5.00	0.435	0.437	43.83	43.58	48.40
8	2.50	5.00	2.50	20.00	0.56	0.461	27.70	40.48	43.46
9	1.25	2.50	20.00	2.50	0.743	0.667	4.07	13.88	27.68
10	1.25	1.25	5.00	10.00	0.423	0.7	27.44	27.44	22.74
对照组	0	0	0	0	0.785	0.764	0	0	

表 2 正交设计因子水平安排及结果

组别	白芍	川芎	当归	熟地	光密度	光密度	降低率	降低率
	A	B	C	D	1	2	Y ₁	Y ₂
1	20	20	20	20	0.294	0.256	76.56	79.59
2	20	20	20	1.25	0.229	0.201	81.75	83.98
3	20	20	1.25	20	0.295	0.259	76.48	79.35
4	20	1.25	1.25	1.25	0.306	0.376	75.61	70.03
5	20	1.25	20	1.25	0.390	0.396	68.91	68.43
6	20	1.25	1.25	20	0.321	0.292	74.41	76.72
7	1.25	20	1.25	1.25	0.743	0.740	40.77	41.01
8	1.25	20	20	20	0.454	0.428	63.81	65.88
9	1.25	20	1.25	1.25	0.754	0.739	39.90	41.09
10	1.25	1.25	20	1.25	1.018	1.134	18.85	9.61
11	1.25	1.25	1.25	20	0.940	0.915	25.07	27.06
12	1.25	1.25	20	20	1.140	1.138	9.13	9.29
对照组	0	0	0	0	1.171	1.338	0	0

表 3 不同回归方程比较

方法	逐步回归	回归方程	t ₁	t ₂	t ₃	F 值	R 值	估计值
UD	前进法	Y= 15.15+ 20.44lnA + 2.89lnB	3.90	9.57	1.36	70.97	0.9450	85.08
	后退法	Y= 17.48+ 21.89lnA	4.90	11.60	—	133.86	0.9389	83.07
OD	前/后法	Y= 17.66+ 15.64lnA + 7.13lnB	4.43	10.45	4.76	65.91	0.9288	85.87

3 结果分析

表 3 列出了 UD 法 20 例、OD 法 24 例的线性回归方程,两方程均显示四物汤中白芍降低大鼠肝 LPO 的作用最强,川芎可能有一定作用,而当归和熟地无作用。各药间未见明显交互作用。

表 1 最后一列(Y)为 UD 方案值(表 1 前两列的自然对数)代入正交回归方程后的预测值。Y 与均匀设计的观察值比较,其相关系数为 0.9267,说明两种方法所得结果基本一致,有较好的相关性。

4 单味白芍和四物汤的比较

两种试验设计结果均表明四物汤体外抗大鼠肝 LPO 应重用白芍。因此,取白芍 20mg/ml 与四物汤

原方(总药量为 20mg/ml)比较,每方做 4 管,结果白芍与原方抗 LPO 的百分率分别为:86.28 与 37.17。单味白芍抗 LPO 效果明显优于原方,且与两个回归方程的预测值相近。

5 讨论

抗 LPO 是常用的药物抗衰老指标之一,四物汤的抗 LPO 作用未见有报导。我们在探索实验条件时发现,四物汤原方降 LPO 作用不明显。用 UD 对该方进行拆方分析表明,方中白芍有很强的抗 LPO 作用,是发挥该作用的君药,原方中白芍的量较低可能掩盖了其作用,当归和熟地均较弱,各药之间未见明显交互作用。表明 UD 具有探索方剂配伍内在规律的能力。

为了验证 UD 结果的精确性,本文用实验次数相当的 OD 进行了比较分析,发现两法所得回归方程及其 t 值、F 值、R 值或理论最大值均基本一致。运用 UD 方案值代入正交回归方程,所得预测值与 UD 实验值有显著相关性,R= 0.9267,说明两种方法在此实验中所获得结果基本一致。实验采用较少样本就得到如此一致结果,主要原因是本实验采用体外法测肝脏 LPO 含量,样本来自同一动物,无个体差异,实验操作可控性好,变异系数较小。从实验设计角度考虑,表面上看,UD 仅设了 2 个重复管,但因每个水平均有一次重复,因而实际上相当于每个水平有 4 个样本;同样地,OD 也相当于设计了 12 个样本。因而也保证了一定的重复性。实验设计时,如果水平数不重复,则应当适当增加组内样本数。当然,如果条件许可,还应多设重复样本,以减少实验误差。这在个体差异较大的整体动物实验时尤为重要^[3]。

从实验结果看,与 OD 相比,UD 除了能迅速找到方中的君药外,因实验水平数较多而能探索较大的剂量范围,所以实验组数也较少,建议在粗筛处方时优先选择。

参考文献:

- [1] 王鹏,王玉珠,沈建民.均匀设计及其在药学中的应用[J].沈阳药学院学报,1989,6(4):297.
- [2] 陈奇.中药药理实验方法[M].人民卫生出版社,1994.191.
- [3] 余日跃,朱家谷,谢文光,等.均匀设计法对中医方剂大承气汤泻下作用的实验研究[J].中药药理与临床,1999,15(5):7.