复方人参健体方的处方优化及其抗疲劳活性和急性毒性研究Δ

睢博文[1*]，马翠霞[2,3]，苗　磊[1,3]，王　苗[2,3]，张荣榕[1,3]，马馨桐[1,3]，赵大庆[1,3]，邵　帅[2,3#a]，严铭铭[1,3#b]（1.吉林省人参科学研究院，长春　130117；2.长春中医药大学药学院，长春　130117；3.长春中医药大学吉林省中药保健食品科技创新中心，长春　130117）

中图分类号　R285.5；R283　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2020）08-0926-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.06

摘　要　目的：优化复方人参健体方4种组方药材（人参、山药、枸杞子、益智仁）的配比，并考察其抗疲劳活性及急性毒性。方法：通过水提取、浓缩、减压干燥制备复方人参健体方水提物。采用单因素试验，以小鼠负重游泳时间为指标，考察人参、山药、枸杞子、益智仁的处方量等4个因素的影响。在单因素试验的基础上，以小鼠负重游泳时间和运动后血清尿素氮含量、肝糖原含量和血乳酸曲线下面积的综合评分为评价指标，采用Box-Behnken响应面法优化处方配比。将小鼠分为空白对照组（水）、阳性对照组（人参红景天胶囊，0.135 g/kg）和复方低、中、高剂量组[最优配比复方人参健体方提取物（以下简称“优化复方”）4.08、8.16、12.24 g/kg，以生药量计]，灌胃给药或水20 mL/kg，每日1次，连续30 d。以给药后小鼠的负重游泳时间和运动后血清尿素氮含量、肝糖原含量和血乳酸曲线下面积的综合评分验证优化复方的抗疲劳活性；同时，以复方中剂量组小鼠的测定数据计算综合评分，比较其与理论预测值的差距。对小鼠灌胃优化复方（总剂量为16.00 g/kg，以提取物计），连续14 d观察并记录小鼠的一般状态、体质量变化、中毒特征以及死亡情况等，并测定半数致死量（LD_{50}）和最大耐受剂量（MTD）。结果：复方人参健体方的最优处方配比为人参1.5 g、山药10 g、枸杞子10 g、益智仁3 g。抗疲劳活性验证试验显示，优化复方较空白对照组可显著延长小鼠负重游泳时间，降低血清尿素氮含量和血乳酸含量及曲线下面积（低剂量组除外），提高肝糖原含量（$P<0.05$或$P<0.01$）；且复方中剂量组的综合评分平均值为96.95分，与理论预测值97.01分仅相差0.06%。急性毒性实验显示，小鼠均未见死亡现象发生，优化复方的经口MTD均大于15 g/kg，属无毒级。结论：优化的复方人参健体方对小鼠具有显著的抗疲劳活性，且未见明显毒副作用。

关键词　复方人参健体方；Box-Behnken响应面法；处方筛选；抗疲劳；安全性；小鼠

Formulation Optimization of Compound Renshen Jianti Formulation and Study on Its Anti-fatigue Activity and Acute Toxicity

SUI Bowen[1], MA Cuixia[2,3], MIAO Lei[1,3], WANG Miao[2,3], ZHANG Rongrong[1,3], MA Xintong[1,3], ZHAO Daqing[1,3], SHAO Shuai[2,3], YAN Mingming[1,3]（1. Jilin Ginseng Academy, Changchun 130117, China; 2. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Jilin Province TCM Health Food Science and Technology Innovation Center, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE: To optimize the ratio of four components of Compound renshen jianti formulation (*Panax ginseng*, *Dioscorea oppositifolia*, *Lycium barbarum* fruit, *Alpinia oxyphylla*), and to investigate its anti-fatigue activity and acute toxicity. METHODS: The water extract of Compound renshen jianti formulation was prepared by water extraction, concentration and decompression drying. By single factor tests, using weight-bearing swimming time as index, the effects of four factors were investigated, such as the amount of *P. ginseng*, *D. oppositifolia*, *L. barbarum* fruit, *A. oxyphylla*. On the basis of single factor tests, using comprehensive score of weight-bearing swimming time, serum urea nitrogen content, liver glycogen content and AUC of blood lactate after exercise as index, the formulation was optimized by Box-Behnken response surface method. The mice was divided into blank control group (water), positive control group (Renshen hongjingtian capsules, 0.135 g/kg) and compound low-dose, medium-dose and high-dose groups [the optimal ratio of Compound renshen jianti formulation extract (called "optimal compound formulation" for short) 4.08, 8.16, 12.24 g/kg, by crude drug], intragastric administration of drug or distilled water 20 mL/kg, once a day, for consecutive 30 d. The weight-bearing swimming time, the contents of serum urea nitrogen, liver glycogen and blood lactate AUC after exercise were used to optimize its anti-fatigue activity of optimal compound formulation. The comprehensive score was calculated based on the measured data of mice in the compound formulation middle-dose group, and the difference between it and the theoretical prediction value was compared. The mice were given optimal compound formulation intragastrically (total dose 16.00 g/kg, by extract). The general state, body mass change, toxic characteristics and death of mice were observed and recorded

Δ 基金项目：国家重点研发计划项目（No.2017YFC1702100）；吉林省科技发展计划项目（No.20180623041TC，No.20170311045YY）；吉林省教育厅项目（No.JJKH20190482KJ）

＊助理研究员，博士。研究方向：中药化学。E-mail：suibowen@163.com

通信作者a：副教授，博士。研究方向：药物化学、中药化学及新药开发。E-mail：ss36038612@163.com

通信作者b：教授，博士生导师，博士。研究方向：药物化学、中药化学及新药开发。E-mail：386759102@qq.com

for 14 days. Median lethal dose (LD_{50}) and maximum tolerated dose (MTD) were measured. RESULTS: The optimal formulation ratio of Compound renshen jianti formulation included that *P. ginseng* 1.5 g, *D. oppositifolia* 10 g, *L. barbarum* fruit 10 g, *A. oxyphylla* 3 g. Results of anti-fatigue activity validation test showed that the optimal compound formulation could significantly prolonged weight-bearing swimming time, reduced serum content of urea nitrogen, blood lactate content and its AUC (except for low-dose group), while significantly increased the content of liver glycogen ($P<0.05$ or $P<0.01$). Average comprehensive score of medium-dose group was 96.95, which was only 0.06% different from the theoretical prediction value of 97.01. The results of acute toxicity test showed that there was no death in mice. The oral MTD of the optimal compound formulation was more than 15 g/kg, which was non-toxic. CONCLUSIONS: The optimal Compound renshen jianti formulation has effective anti-fatigue activity of mice, and has no significant toxic effect.

KEYWORDS Compound renshen jianti formulation; Box-Behnken response surface method; Formulation screening; Anti-fatigue; Acute toxicity; Mice

疲劳在中医学上属于“劳”“虚劳”的范畴,《内经·素问·举痛论》言曰“劳则气耗”,即劳动或运动可导致机体阳气不足而引发肢软乏力、神疲倦怠等气虚证候,形成体力疲劳[1]。世界卫生组织(WHO)的一项全球性调查结果表明,真正健康的人只占5%,患有疾病的人占20%,而75%的人则长期处于疲劳等“亚健康”状态[2]。目前,市场上缓解体力疲劳的药物主要以化学药为主,但长期服用易使患者产生药物依赖性,还可引起过度兴奋、激素水平失衡等不良反应[3]。近年来,中药在抗疲劳方面表现出效果明显、毒副作用低且不会引发兴奋中枢、焦虑、心血管疾病等优势,逐渐受到国内外学者的关注[4]。

复方人参健体方是长春中医药大学附属医院治未病中心的经验方,该方源由金樱膏(《古今医统》卷四十六)、大补元煎(《景岳全书》卷五十)、右归丸(《景岳全书》卷五十一)、守中丸(《圣济总录》卷十六)、加味地黄丸(《寿世保元》卷五)、延龄固本方(《良朋汇集》卷二引王世功集方)、长生固本方(《寿世宝元》卷四)、固本健阳丹(《万病回春》卷六)、大补丸(《竹林女科证治》)等古方经加减而得,其组方药材包括人参、山药、枸杞子、益智仁。经该院临床实践证明,该方健补脾胃、益肾固精、缓解疲劳、增强体力之功效显著。为进一步开发利用该方剂,本课题组在上述研究背景下,对该复方进行处方配比的优化,评价其抗疲劳功效并考察其安全性,为我国中药传统方剂的中药现代化研发与应用奠定实验基础。

1 材料

1.1 仪器

ALB-224型万分之一分析天平(德国Sartorius公司);Infinite M200PRO型全自动酶标仪(瑞士Tecan公司);DZTW型电子调温电热套(北京市永光明医疗仪器有限公司);JM01-ZH-XSC型恒温游泳箱(河南精迈仪器仪表有限公司);D1008E型离心机(美国Scilogex公司)。

1.2 药品与试剂

人参(批号:20170328)、山药(批号:20170725)、枸杞子(批号:20170713)、益智仁(批号:20171025)各药材饮片均购自吉林省仙草医药药材有限公司,经长春中医药大学药学院姜大成教授鉴定,均为合格的饮片产品。

人参红景天胶囊(湖南金六谷药业有限公司,批号:10619002,规格:0.45 g);尿素氮检测试剂盒、糖原检测试剂盒、乳酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20180628、20180719、20180718);0.9%氯化钠注射液(江西省创欣药业集团有限公司,作为生理盐水使用);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量18~22 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产合格证号:SCXK(辽)2015-0003。饲养环境为清洁级,室温为20~25 ℃,相对湿度为40%~60%,通风换气次数为14次/h,光照良好,每日更换垫草料,提供标准饲料喂养。小鼠均适应性饲养7 d后,进行相应抗疲劳分组实验。

2 方法

2.1 复方健体方提取物制备

按照一定的处方配比称取人参、山药、枸杞子、益智仁4味药材,混合后适当粉碎,加8倍量水(mL/g),加热回流提取2次,每次1 h;滤过,合并滤液,水浴蒸干浓缩,减压干燥,粉碎,过80目筛,即得。

2.2 不同配比复方人参健体方提取物的抗疲劳效果比较

2.2.1 给药剂量确定 假设复方人参健体方4味组方药材人参、山药、枸杞子、益智仁的人日服处方量分别为a、b、c、d(以生药量计,单位均为g,下同),按成人体质量60 kg以及人与小鼠的体表面积换算[5]得小鼠的等效处方量为9.2×(a+b+c+d)g/60 kg,为操作方便并取等效剂量的2倍,将小鼠的给药剂量设置为20×(a+b+c+d)g/60 kg。在前期预实验基础上,小鼠每日灌胃复方人参健体方提取物药液,灌胃体积为20 mL/kg,每日灌胃1次,连续30 d后,进行后续抗疲劳效果考察。

2.2.2 小鼠负重游泳时间测定 实验前1 h小鼠禁食不禁水,在其末次给药30 min后,在尾根部负荷占体质量5%的铅皮,然后将其置于水深30 cm、水温(30±2)℃的

恒温游泳箱中进行游泳负重实验。每次下水的小鼠不超过4只，彼此不得靠近。用秒表记录小鼠从入水至头部全部没入水中（以小鼠鼻孔下沉入水并持续8 s未能浮出水面为准）为止的时间，作为小鼠负重游泳时间。

2.2.3 小鼠运动后血清尿素氮含量的测定 在末次给药30 min后，将小鼠置于“2.2.2”项下恒温游泳箱中不负重游泳90 min，游泳结束休息30 min后，摘其眼球采血，以3 000 r/min离心10 min。取上层血清，按尿素氮检测试剂盒说明书方法操作，测定血清中尿素氮含量。

2.2.4 小鼠运动后肝糖原含量的测定 在末次给药30 min后，将小鼠置于“2.2.2”项下恒温游泳箱中不负重游泳90 min，游泳结束后立即颈椎脱臼处死，取出肝脏，置于冰生理盐水中剔除结缔组织，然后以滤纸吸干。称取适量肝脏组织，按糖原检测试剂盒说明书方法操作，测定肝糖原含量。

2.2.5 小鼠运动后血乳酸含量及其曲线下面积的测定 末次给药30 min后，于小鼠眼眶静脉丛取血0.1 mL（血样置于肝素钠处理的采集管中抗凝，下同），然后将其置于“2.2.2”项下恒温游泳箱中不负重游泳10 min。分别于游泳结束后第0、20 min时于其眼眶静脉丛再取血0.1 mL。取上述全血样品，按乳酸检测试剂盒说明书方法分别测定游泳前后3个不同时间点血乳酸含量，并按公式计算血乳酸曲线下面积[6-7]：血乳酸曲线下面积＝5×（游泳前血乳酸含量+3×游泳结束后第0 min时的血乳酸含量+2×游泳结束后第20 min时的血乳酸含量）。

2.3 单因素试验初步筛选复方人参健体方的处方配比

结合临床用药剂量及本课题组前期预试验结果，以人参处方量（A）2 g，山药处方量（B）7 g、枸杞子处方量（C）8 g、益智仁处方量（D）3 g为基础因素条件。单独调整每个因素水平，具体为：（1）固定山药、枸杞子、益智仁处方量分别为7、8、3 g，考察人参不同处方量（1、1.5、2、2.5、3 g）；（2）固定人参、枸杞子、益智仁处方量分别为2、8、3 g，考察山药不同处方量（3、5、7、9、11 g）；（3）固定人参、山药、益智仁处方量分别为2、7、3 g，考察枸杞子不同处方量（4、6、8、10、12 g）；（4）固定人参、山药、枸杞子处方量分别为2、7、8 g，考察益智仁不同处方量（1、2、3、4、5 g）。按上述配比共设计20组试验，每组10只小鼠，按“2.2.1”“2.2.2”项下方法给药后进行小鼠负重游泳时间考察，初步比较复方人参健体方不同处方配比的抗疲劳效果。

2.4 Box-Behnken响应面法优化复方人参健体方的处方配比

以单因素试验结果为基础，进行Box-Behnken响应面试验。以人参处方量（A，g）、山药处方量（B，g）、枸杞子处方量（C，g）、益智仁处方量（D，g）为自变量，以小鼠负重游泳运动时间和运动后血清尿素氮、肝糖原、血乳酸等4个指标的综合评分值为因变量（响应面值），设计不同处方配比的4因素3水平响应面试验方案并进行分组实验，每组10只小鼠，按“2.2”项下方法给药后进行小鼠抗疲劳效果考察。考虑到抗疲劳活性以小鼠运动能力为主、血液/组织中相关生化指标为辅，分别对小鼠负重游泳时间、血清尿素氮含量、肝糖原含量、血乳酸曲线下面积等4项指标赋予权重0.4、0.2、0.2、0.2，则综合评分（Y）＝0.4×小鼠负重游泳时间/小鼠负重游泳时间最大值+0.2×血清尿素氮含量最小值/血清尿素氮含量+0.2×肝糖原含量/肝糖原含量最大值+0.2×血乳酸曲线下面积最小值/血乳酸曲线下面积。采用Y值综合比较复方人参健体方不同处方配比的抗疲劳效果。Box-Behnken设计的因素与水平见表1。

表1 Box-Behnken设计的因素与水平

Tab 1 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素			
	人参处方量（A），g	山药处方量（B），g	枸杞子处方量（C），g	益智仁处方量（D），g
−1	1	8	9	2
0	1.5	9	10	3
1	2	10	11	4

2.5 最优配比复方人参健体方的抗疲劳活性验证试验

按“2.4”项下Box-Behnken响应面法优选的复方人参健体方日服处方量配比称取4种组方药材饮片，混合后适当粉碎，按“2.1”项下方法提取，得提取物4.9 g（得率为20.00%）。按成人体质量60 kg计算每1 kg体质量的成人日服总生药量（4种组方饮片质量之和为24.5 g，下同）为0.408 g/kg。分别以该人体服用剂量的10、20、30倍作为小鼠给药的低、中、高剂量（4.08、8.16、12.24 g/kg，以生药量计）。

取200只小鼠，分为空白对照组、阳性对照组（人参红景天胶囊，0.135 g/kg，剂量参考“2.2.1”项下方法进行设置，相当于人日用量的20倍）和复方低、中、高剂量组[最优配比复方人参健体方提取物（以下简称为“优化复方”），以生药量计算]，每组40只。复方各剂量组小鼠灌胃优化复方溶液，阳性对照组小鼠灌胃人参红景天胶囊药液，空白对照组小鼠灌胃等体积水，灌胃体积均为20 mL/kg，每日灌胃1次，连续30 d。

首次灌胃给药前及末次灌胃给药前测定并记录小鼠体质量，观察小鼠生长发育及活动情况。末次给药后按“2.2.2”～“2.2.5”项下操作，分别测定小鼠抗疲劳试验4项指标（每项指标10只小鼠），验证优化复方对小鼠的抗疲劳活性。以复方中剂量组小鼠的测定数据计算综合评分（Y），比较其与理论预测值的差距。

2.6 最优处方配比复方人参健体方的小鼠急性毒性实验

参照本课题组前期研究[8]，取小鼠20只，雌雄各半，灌胃优化复方溶液（以水配制成0.40 g/mL的药液，以提取物计），每次20 mL/kg，灌胃2次，给药间隔6 h[灌胃总剂量为16.00 g/kg（以提取物计），相当于“2.4”项下优选的成人日服用剂量的约196倍]。给药后，连续14 d观察并记录小鼠的一般状态、体质量变化、中毒特征以及死亡情况等，并测定半数致死量（LD_{50}）和最大耐受剂量（MTD）。

2.7 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件处理所得数据。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素分析数据的正态分布，符合正态分布时采用单因素方差分析进行多组间比较，采用t检验进行组间两两比较。$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 复方人参健体方的单因素试验筛选结果

单因素试验结果显示，当人参处方量为1.5 g、山药处方量为9 g、枸杞子处方量为10 g、益智仁处方量为3 g时，相应给药组小鼠的负重游泳时间即可达到最大值并趋于稳定。以此为基础，采用Box-Behnken响应面法进一步优化复方人参健体方处方。单因素试验结果见图1。

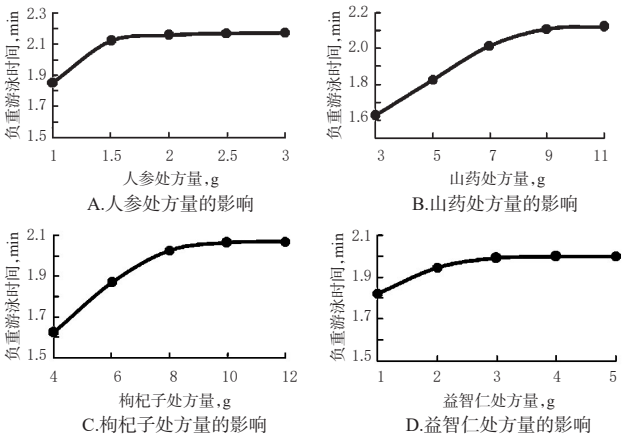


图1 单因素试验结果

Fig 1 Results of signal factor tests

3.2 复方人参健体方的Box-Behnken响应面法优化结果

按Box-Behnken响应面试验设计方案的不同配比复方人参健体方的试验结果见表2。

采用Design-Expert 8.0.5.0软件对人参、山药、枸杞子、益智仁的处方量与综合评分(Y)进行多元回归拟合，得到二元多项回归方程：$Y=96.348+0.529\ 2A+1.551\ 67B+1.249\ 1C-2.041\ 67D-3.862\ 5AB-2.952\ 5AC+0.907\ 5AD+0.117\ 5BC-1.59BD-0.682\ 5CD-5.134A^2-4.170\ 25B^2-4.792\ 75C^2-4.792\ 75D^2$。

对模型回归方程各项进行方差分析，结果见表3。由表3可见，模型$F=11.314\ 6$，$P<0.000\ 1$，说明模型极显著；失拟项$F=0.173\ 3$，$P=0.476\ 1$，说明模型失拟项不显著；模型的确定系数R^2为0.928 8，接近1，说明该回归模型与试验数据拟合度较高，可采用此模型对综合评分进行分析和预测。回归方程的一次项B、C、D和交互项AB、AC($P<0.05$)，以及二次项A^2、B^2、C^2、D^2($P<0.01$)对综合评分的影响均可达到显著水平。根据回归分析中F值排序(F值越大，影响越大)，可知各因素对综合评分的影响大小排序为：益智仁处方量(D)>山药处方量(B)>枸杞子处方量(C)>人参处方量(A)。

表2 Box-Behnken设计方案及结果

Tab 2 Plan and results of Box-Behnken design

试验号	A	B	C	D	负重游泳时间，min	尿素氮含量，mmol/L	肝糖原含量，mg/100 g	血乳酸曲线下面积	Y
1	0	0	−1	−1	19.74	6.81	1 331.05	119.93	85.81
2	0	0	−1	1	18.84	6.96	1 344.78	124.35	83.55
3	0	−1	1	0	20.91	6.84	1 362.50	118.81	88.08
4	0	0	0	0	24.12	6.66	1 432.90	118.12	94.44
5	0	0	1	1	19.92	6.86	1 350.14	119.45	86.27
6	0	1	0	−1	24.82	6.61	1 443.98	118.02	95.80
7	−1	1	0	0	22.18	6.84	1 363.11	116.51	90.36
8	0	−1	0	−1	19.89	6.82	1 350.57	119.90	86.27
9	0	−1	−1	0	19.86	6.87	1 350.14	118.76	86.27
10	−1	0	0	1	19.01	6.95	1 347.98	123.55	84.00
11	0	0	0	0	24.02	6.62	1 474.41	115.87	95.35
12	0	−1	0	1	18.72	6.88	1 344.12	124.56	83.55
13	1	1	0	0	18.44	6.85	1 339.13	124.98	83.09
14	1	0	0	1	19.91	6.83	1 350.14	119.89	86.27
15	0	1	0	1	19.92	6.79	1 365.73	119.23	86.72
16	0	0	0	0	26.50	6.58	1 463.73	116.12	98.98
17	−1	0	−1	0	18.27	6.93	1 357.34	123.45	83.09
18	1	−1	0	0	21.43	6.39	1 343.54	119.12	89.90
19	−1	0	1	0	22.49	6.71	1 341.56	119.85	90.36
20	−1	−1	0	0	18.01	6.96	1 335.56	127.61	81.72
21	1	0	0	−1	20.28	6.86	1 366.14	118.48	87.18
22	0	0	0	0	24.71	6.61	1 445.02	117.12	95.80
23	0	1	1	0	22.48	6.82	1 353.88	118.81	90.36
24	0	0	0	0	24.93	6.58	1 493.43	115.33	97.17
25	1	0	−1	0	21.99	6.76	1 445.12	117.39	91.26
26	−1	0	0	−1	21.30	6.88	1 353.54	118.12	88.54
27	1	0	1	0	20.12	6.81	1 354.62	119.81	86.72
28	0	1	−1	0	20.60	6.66	1 359.23	118.89	88.08
29	0	0	1	−1	23.21	6.92	1 353.76	118.25	91.26

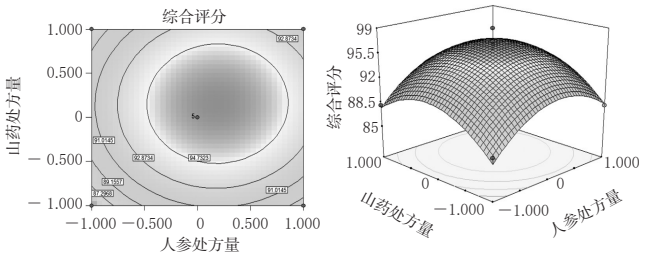
表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	558.078 7	14	39.862 8	11.314 6	<0.000 1
A	3.360 2	1	3.360 2	0.953 8	0.345 3
B	28.892	1	28.892 0	8.200 7	0.012 5
C	18.725	1	18.725 0	5.314 9	0.037 0
D	50.020 8	1	50.020 8	14.197 9	0.002 1
AB	59.675 6	1	59.675 6	16.938 3	0.001 2
AC	34.869	1	34.869 0	9.897 2	0.007 1
AD	3.294 2	1	3.294 2	0.935 0	0.350 0
BC	0.055 2	1	0.055 2	0.015 7	0.902 1
BD	10.112 4	1	10.112 4	2.870 3	0.112 3
CD	1.863 2	1	1.863 2	0.528 9	0.479 1
A^2	170.970 5	1	170.970 5	48.528 3	<0.000 1
B^2	112.806 4	1	112.806 4	32.019 0	<0.000 1
C^2	106.736 4	1	106.736 4	30.296 0	<0.000 1
D^2	148.997 5	1	148.997 5	42.291 5	<0.000 1
残差	49.323 6	14	3.523 1		
失拟项	36.783 7	10	3.678 4	1.173 3	0.476 1
纯误差	12.539 9	4	3.135 0		
总误差	607.402 3	28			

采用Design-Expert 8.0.5.0软件对响应面试验数据进行回归拟合，得到响应面图，见图2～图7。以Y值的回归模型的极值分析得到最优处方量为：人参1.42 g、山药9.72 g、枸杞子10.24 g、益智仁2.71 g。在上述最优处

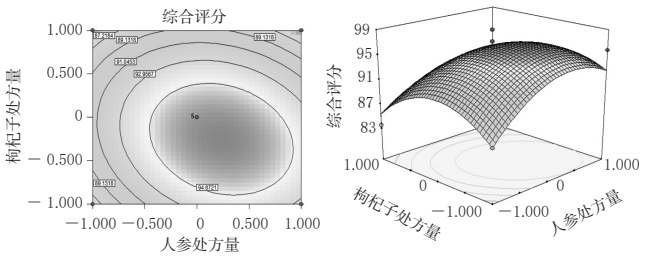
方量条件下，*Y*的预测值为97.01。考虑实际操作的可行性，将处方优化为人参1.5 g、山药10 g、枸杞子10 g、益智仁3 g。



A.等高线图　　B.响应面图

图2　人参和山药的处方量对综合评分的影响

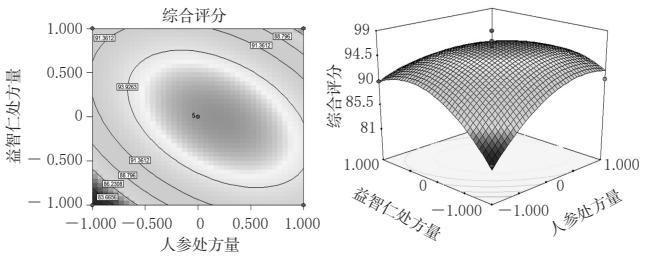
Fig 2　Effects of the formulation amount of *Panax ginseng* and *Dioscorea oppositifolia* on comprehensive score



A.等高线图　　B.响应面图

图3　人参和枸杞子的处方量对综合评分的影响

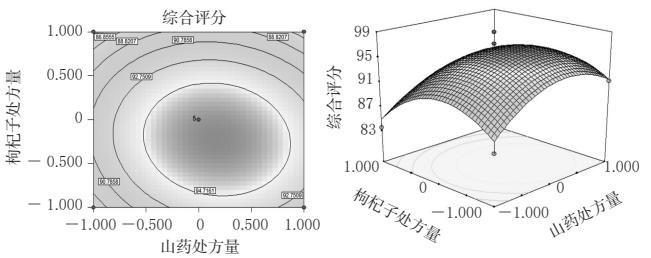
Fig 3　Effects of the formulation amount of *P. ginseng* and *Lycium barbarum* fruit on comprehensive score



A.等高线图　　B.响应面图

图4　人参和益智仁的处方量对综合评分的影响

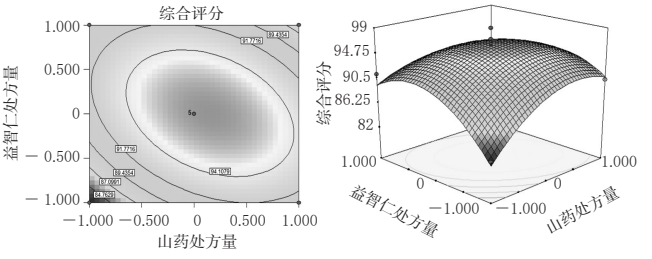
Fig 4　Effects of the formulation amount of *P. ginseng* and *Alpinia oxyphylla* on comprehensive score



A.等高线图　　B.响应面图

图5　山药和枸杞子的处方量对综合评分的影响

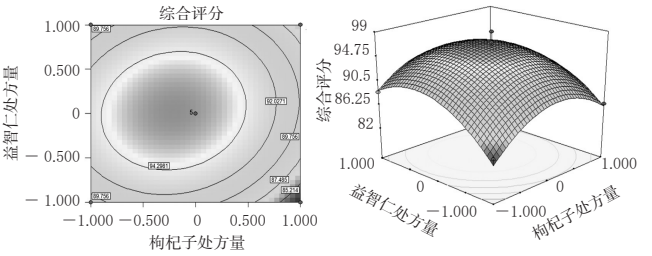
Fig 5　Effects of the formulation amount of *D. oppositifolia* and *L. barbarum* fruit on comprehensive score



A.等高线图　　B.响应面图

图6　山药和益智仁的处方量对综合评分的影响

Fig 6　Effects of the formulation amount of *D. oppositifolia* and *A. oxyphylla* on comprehensive score



A.等高线图　　B.响应面图

图7　枸杞子和益智仁的处方量对综合评分的影响

Fig 7　Effects of the formulation amount of *L. barbarum* fruit and *A. oxyphylla* on comprehensive score

3.3　最佳配比复方人参健体方的抗疲劳活性验证结果

3.3.1　对小鼠体质量的影响　实验过程中，各组小鼠生长发育及健康状况均良好，且活动正常，无异常表现；灌胃给药前及末次灌胃给药前，与正常对照组比较，阳性对照组和复方低、中、高剂量组小鼠的体质量差异均无统计学意义（$P>0.05$），详见表4。

表4　各组小鼠体质量和负重游泳时间的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 4　Results of body weight and weight-bearing swimming time in mice of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	小鼠体质量，g		负重游泳时间，min
	灌胃给药前	末次灌胃给药前	
空白对照组	27.60±1.48	38.60±1.75	15.70±4.16
阳性对照组	27.71±1.42	38.92±1.65	36.26±6.55**
复方低剂量组	28.10±1.51	38.80±2.14	19.90±4.58*
复方中剂量组	27.90±1.45	39.10±2.04	26.80±5.87**
复方高剂量组	27.80±1.47	38.70±1.98	33.30±7.89**

注：与空白对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

Note：vs. blank control group，*$P<0.05$，**$P<0.01$

3.3.2　对小鼠负重游泳时间的影响　与空白对照组比较，各给药组小鼠负重游泳时间均显著延长（$P<0.05$或$P<0.01$），详见表4。

3.3.3　对小鼠运动后血清尿素氮含量的影响　与空白对照组比较，各给药组小鼠血清尿素氮含量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），详见表5。

3.3.4　对小鼠肝糖原含量的影响　与空白对照组比较，

各给药组小鼠肝糖原含量显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），详见表6。

表5　各组小鼠血清尿素氮和肝糖原含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 5　Results of content determination of serum urea nitrogen and liver glycogen in mice of each group（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	血清尿素氮，mmol/L	肝糖原含量，mg/100 g	组别	血清尿素氮，mmol/L	肝糖原含量，mg/100 g
空白对照组	7.44±0.64	1 175.91±141.49	复方中剂量组	6.58±0.72*	1 494.73±125.56**
阳性对照组	5.02±0.48**	1 845.00±125.18**	复方高剂量组	5.36±0.74**	1 566.40±107.86**
复方低剂量组	6.87±0.56*	1 351.12±122.77*			

注：与空白对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

Note：vs. blank control group，*$P<0.05$，**$P<0.01$

表6　各组小鼠血乳酸含量及曲线下面积的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 6　Results of blood lactate content and its AUC in mice of each group（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	血乳酸含量，mmmol/L			血乳酸曲线下面积
	游泳前	游泳结束后即刻	游泳结束后休息20 min后	
空白对照组	3.52±1.26	5.12±0.75	4.03±0.56	132.30±16.24
阳性对照组	2.67±1.33**	3.28±0.32**	2.50±0.41**	89.25±14.48**
复方低剂量组	3.41±0.85	4.82±0.99	3.52±0.68	125.40±17.45
复方中剂量组	2.89±0.81*	4.68±0.44*	3.26±0.65*	118.23±11.69*
复方高剂量组	2.62±1.33**	3.62±0.45**	2.78±0.52**	96.34±13.47**

注：与空白对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

Note：vs. blank control group，*$P<0.05$，**$P<0.01$

3.3.5　对小鼠运动后血乳酸含量及曲线下面积的影响　与空白对照组比较，阳性对照组和复方中、高剂量组小鼠在3个不同时间点的血乳酸含量及曲线下面积均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），详见表6。

3.3.6　综合评分验证结果　按复方中剂量组的验证试验结果，小鼠负重游泳运动时间为26.80 min，运动后血清尿素氮为6.58 mmol/L、肝糖原含量为1 494.73 mg/100 g、血乳酸曲线下面积为118.23，则综合评分平均值为96.95，与理论预测值97.01仅相差0.06%，由此可见经Box-Behnken响应面设计优化的处方配比可行。

3.4　小鼠急性毒性实验结果

两种性别的小鼠均未见死亡现象发生，优化复方的经口MTD均大于15 g/kg，急性毒性分级属无毒级[8]，详见表7。

表7　小鼠急性毒性实验结果

Tab 7　Results of acute toxic test of mice

小鼠性别	n	给药前体质量（$\bar{x}\pm s$），g	给药后第14天体质量（$\bar{x}\pm s$），g	形态	中毒特征	死亡只数	MTD，g/kg
雄性	10	19.25±1.32	31.54±2.19	正常	无	0	16
雌性	10	18.97±1.47	30.92±1.75	正常	无	0	16

4　讨论

本课题组以中医经典古方为参照，确定复方人参健体方的组方药材分别为人参、山药、枸杞子和益智仁。为优化该方的药材组方配比，本研究先后采用单因素试验及Box-Behnken响应面优化法，通过抗疲劳实验，以小鼠运动能力结合其血液/组织中相关生化指标的综合评分确定了4种药材的最佳处方用量。同时，对此优化配比组方进行了小鼠抗疲劳活性验证实验以及急性毒性实验，考察优选复方人参健体方的抗疲劳功效和安全性。

经查阅相关文献中常用阳性药[9-11]，同时考虑本复方后续研发方向为抗疲劳制剂，故采用红景天胶囊为阳性对照药，与所优选的复方健体方进行抗疲劳活性的比较。

负重游泳实验是经典抗疲劳活性，本研究在此基础上结合小鼠运动后体内血清尿素氮、肝糖原的含量和血乳酸含量及曲线下面积变化，多指标综合评价不同配比复方人参健体方的抗疲劳效果，使其结果更加可靠。其中，血清中尿素是蛋白质的代谢产物，当机体剧烈运动时，蛋白质及氨基酸的分解代谢增强，氨基酸会代谢转化生成尿素进入血液，使血清尿素氮含量增加，这也是疲劳时出现肌肉酸痛的主要原因，血清尿素氮含量越高，表明身体对运动负荷的适应性越差、越易产生疲劳[12-14]。肝糖原的重要性主要体现在饥饿或运动状态下肝糖原分解进入血液以维持血糖的恒定，当肝糖原被大量消耗时，机体便会产生疲劳[15-16]。因此，肝糖原的含量是检测疲劳是否发生的一项重要指标。乳酸是糖无氧酵解的产物，血乳酸的堆积会使肌肉发生收缩而挤压血管，使得血流不畅、肌肉功能下降，继而使机体产生疲劳[17-18]。因此，血乳酸被认为是影响运动性疲劳的重要因素，可作为评判机体疲劳程度的指标。本研究结果显示，最优配比的复方人参健体方可以显著降低运动后小鼠的血清尿素氮水平，显著提高其肝糖原水平，显著减少其血乳酸的产生和加快乳酸的分解，加之还可显著延长小鼠负重游泳时间，因此证实其可增强小鼠的抗疲劳能力。小鼠急性毒性实验结果显示，小鼠经口MTD均大于15 g/kg，属无毒级。

综上所述，复方人参健体方的最优组方配比为人参1.5 g、山药10 g、枸杞子10 g、益智仁3 g；该优化复方提取物对小鼠具有显著的抗疲劳活性，且未见明显毒副作用，具有良好的开发应用前景，但其具体作用机制还需要一步研究。

参考文献

[1] 李红琼，王天芳，薛晓琳，等.疲劳性亚健康判定标准及中医常见证候的文献研究[J].世界中西医结合杂志，2019，14(6)：768-771.

[2] 吴良文，陈宁.运动性疲劳的机制与大豆多肽对其调控的研究进展[J].食品科学，2019，40(17)：302-308.

[3] 王换换，申正杰，肖航，等.灵芝孢子粉对小鼠抗疲劳作用及生化机制初探[J].营养学报，2019，41(2)：173-177.

[4] 麻海娟，曾丽梅，黄诚.植物雌激素类抗运动疲劳的研究现状[J].赣南医学院学报，2018，38(4)：410-412.

[5] 徐叔云，卞如濂，陈修.药理实验方法学[M].2版.北京：人

冯了性风湿跌打药酒的HPLC指纹图谱建立及其中10种有效成分的含量测定Δ

胡　静[1*]，杨媛媛[2]，崔小敏[1]，任　慧[1]，雷　琨[1]，陈志永[1#]（1.陕西省中医药研究院，西安　710061；2.西安市食品药品检验所，西安　710054）

中图分类号　R284　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2020）08-0932-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.07

摘　要　目的：建立冯了性风湿跌打药酒的高效液相（HPLC）指纹图谱，并测定其中10种有效成分的含量。方法：采用HPLC法。色谱柱为Inertsil ODS-3 C_{18}，流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液（梯度洗脱），流速为1.0 mL/min，柱温为25 ℃，检测波长为210 nm（10～15 min，盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱）、300 nm（70～120 min，桂皮醛）、345 nm（15～70 min，新绿原酸、东莨菪苷、绿原酸、隐绿原酸、东莨菪内酯、异绿原酸A、异绿原酸C），进样量为10 μL。以东莨菪内酯峰为参照，绘制10批样品的HPLC指纹图谱，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》进行相似度评价，确定共有峰。结果：10批样品共有18个共有峰，相似度均大于0.980，共指认出盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、新绿原酸、东莨菪苷、绿原酸、隐绿原酸、东莨菪内酯、异绿原酸B、柚皮苷、异绿原酸A、异绿原酸C、桂皮醛等12个成分。盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、新绿原酸、东莨菪苷、绿原酸、隐绿原酸、东莨菪内酯、异绿原酸A、异绿原酸C、桂皮醛等10个成分检测质量浓度的线性范围分别为2.475～247.5、2.600～260.0、3.820～382.0、3.900～390.0、3.060～306.0、4.760～476.0、4.540～454.0、4.900～490.0、4.540～454.0、7.590～759.0 μg/mL（r 均大于0.999 0）；定量限分别为0.320 0、0.350 0、0.021 4、0.024 3、0.036 8、0.025 7、0.152 1、0.042 9、0.025 1、0.350 3 μg/mL，检测限分别为0.160 0、0.180 0、0.007 9、0.004 0、0.001 2、0.007 3、0.076 0、0.001 4、0.008 1、0.201 4 μg/mL；精密度、重复性、稳定性试验的RSD均小于2%；加样回收率为95.03%～106.85%（RSD为0.67%～2.68%，n=6）；上述10种成分的含量分别为0.013 3～0.214 1 mg/mL。结论：所建指纹图谱稳定、准确、专属性强，可用于冯了性风湿跌打药酒的质量控制；含量测定方法简便快速、准确可靠，可用于同时测定其中10种有效成分的含量。

关键词　冯了性风湿跌打药酒；高效液相色谱法；指纹图谱；含量测定

民卫生出版社，1991：178-180.
[6] 周思敏，田怀军，黄庆愿，等.西洋参醇提取液对模拟高原暴露小鼠的抗疲劳作用研究[J].解放军药学学报，2013，29(4)：297-300.
[7] 马文俊，刘有菊，罗明英.金诃牌欣逸胶囊缓解体力疲劳功能的实验研究[J].临床合理用药杂志，2019，12(33)：54-55.
[8] 赵彧，万志强，张荣榕，等.复方人参免疫增强方配比优选及其对小鼠的免疫活性和急性毒性研究[J].中国药房，2020，31(2)：196-201.
[9] 郭超萍，张兵，包传红.龙眼肉水提物对小鼠抗疲劳及耐缺氧作用实验研究[J].亚太传统医药，2019，15(10)：14-16.
[10] 李娟，张一唱，崔光红，等.九香虫提取物的抗疲劳和补肾壮阳活性评价[J].中南民族大学学报（自然科学版），2018，37(2)：45-48.
[11] 毛婷，李茂星，王先敏，等.栀子中抗缺氧耐疲劳活性组分的筛选研究[J].解放军药学学报，2017，33(1)：33-36.
[12] ZHENG Y，ZHANG WC，WU ZY，et al. Isolation of an anti-fatigue preparation from cellulase-treated maca by hydroalcoholic extraction[J]. *Curr Top Nutraceut R*，2019，17(1)：93-98.
[13] 王换换，申正杰，肖航，等.灵芝孢子粉对小鼠抗疲劳作用及生化机制初探[J].营养学报，2019，41(2)：173-177.
[14] 杨彦哲，张红，张丹，等.赶黄草总黄酮缓解体力疲劳的作用研究[J].中国医院药学杂志，2017，37(5)：430-434.
[15] HUANG YM，WANG YF，LI WJ，et al. Evaluation of anti-fatigue property of Porphyridium cruentum in mice[J]. *Trop J Pharm Res*，2019，18(3)：579-584.
[16] 朱虎虎，康金森，玉苏甫·吐尔逊，等.新疆大枣汁抗小鼠一次性力竭运动疲劳作用的研究[J].中国实验方剂学杂志，2013，19(11)：232-234.
[17] 曹俊岭，薛春苗，王艳梅，等.红景天颗粒缓解疲劳作用的研究[J].中华中医药杂志，2014，29(6)：1969-1971.
[18] HWANG KA，HWANG YJ，HWANG IG，et al. Effects of low temperature-aged garlic on exercise performance and fatigue in mice[J]. *J Med Food*，2019，22(9)：944-951.

（收稿日期：2019-11-19　修回日期：2020-03-15）
（编辑：段思怡）

Δ 基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81973419）；国家自然科学基金青年科学基金项目（No.81603264）；陕西省创新人才推进计划-青年科技新星项目（No.2018KJXX-073）；陕西省重点研发计划一般项目（No.2019SF-302，No.2018SF-302）；西安市科技计划项目[No.201805103YX11SF37(17)，No.2019115613YX011SF044(13)]

＊主管药师，硕士。研究方向：中药活性成分与质量控制。电话：029-85395696。E-mail：huj668@163.com
＃通信作者：副研究员，博士。研究方向：中药活性成分与质量控制。电话：029-85395696。E-mail：chenzy0612@163.com