

阿司匹林、布他比妥和咖啡因联用对小鼠的镇痛作用及其急性毒性的定量分析*

郑青山 桂常青¹ 孙瑞元¹ (芜湖 241001 皖南医学院弋矶山医院临床药理研究所; ¹ 药物研究所)

摘要 目的:应用配方均匀设计法,定量分析阿司匹林、布他比妥和咖啡因联用对小鼠的镇痛作用及其急性毒性,并探讨该法在多药物联用分析中的应用。方法:设置7个水平联用比例和剂量,用小鼠甩尾法作镇痛试验,综合数理分析结果和专业知 识,由验证性试验确定理论预期结果,并参考配伍对小鼠行为的影响,确定最优配方;用参数法定量分析3药联用的急性毒性作用。结果:阿司匹林41 mg/kg,布他比妥6.4 mg/kg和咖啡因5 mg/kg联用对小鼠的镇痛有协同作用,对小鼠的行为影响较小;其联用的合适比例为8.1:1.25:1;联用时其急性毒性的相互作用表现为相加(无协同作用)。结论:阿司匹林、布他比妥和咖啡因3药联用效果增强,但急性毒性未增;配方均匀设计法可用于多药物联用的定量分析,但有一定的局限,其结果需经实验验证。

关键词 阿司匹林;布他比妥;咖啡因;均匀设计;药物联合治疗;药物协同作用;药物拮抗作用;药物相互作用

Quantitative analysis of analgesic effect and acute toxicity of aspirin, butabital and caffeine in combination to mice

Zheng Qingshan (Zheng QS), Gui Changqing (Gui CQ), Sun Ruiyuan (Sun RY) (Institute of Clinical Pharmacology of Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To analyzed quantitatively the analgesic effect and acute toxicity of aspirin (Asp), butabital (But) and caffeine (Caf) in combination with the method of the formula uniform design and study the feasibility of this method to analyze multidrug effects. **METHOD:** According to the formula uniform design method, 7 different doses at 7 different proportions were administered (ig) to observe the analgesic effect to mice by the mouse tail-flick test. The optimum doses and proportion in combination were obtained from the experimental data, mathematical analysis and the special field demand, which were demonstrated by another experiments (the mouse tail-flick test and the light-electric vibrating box method). Acute toxicity of the combination was quantitatively analyzed by the parameter method. **RESULTS and**

* 由国家自然科学基金(39670845),安徽省自然科学基金(98454735)和卫生部科研基金(94-1-335)资助

CONCLUSION:The combination of Asp 41 mg/kg, But 6.4 mg/kg and Caf 5 mg/kg (proportion as 8.1:1.25:1) was appropriate and the acute toxicity was not increased. The formula uniform design method can be effectively applied to analyze the multidrug effects under some limited conditions, but the results must take a special field demand into account, and the estimated optimum dose and proportion for combination will be demonstrated by further experiment.

KEY WORDS aspirin, butabital, caffeine, combination drug therapy, drug synergism, drug antagonism, drug interactions

布他比妥(butabital, But)是短效的巴比妥类药物衍生物,它和咖啡因(caffeine, Caf),以及解热镇痛药,如阿司匹林(aspirin, Asp)扑热息痛、异丙氨基比林、氨基比林等联用时,可使镇痛作用明显增强,已有多个临床报道^[1]。各家报道中,But, Caf与解热镇痛药的联用比例和剂量有所不同,作为联用依据的定量化研究较少,甚至有报道认为Caf只有抵消But的过度镇痛作用^[2]。本研究采用高效的配方均匀设计法^[3-6],从药效学角度定理分析Asp, But和Caf联用的合适比例和联用剂量,在此基础上用参数法^[7]分析其联用的毒性变化,为这类复方制剂开发提供实验依据和方法学参考。

1 材料和方法

1.1 药物

But(吉林省通化林海制药厂,纯度99.1%,批号:970512);Asp(吉林制药厂,纯度99.5%);Caf(吉林省舒兰合成药厂)。均用5%羧甲基纤维素钠配制所需浓度的混悬剂。

1.2 动物

昆明种小鼠,(20±2)g,雌雄各半[南京医科大学实验动物中心,合格证号:苏动(质)第97001号]。动物室

表1 配方均匀设计中Asp, But和Caf联用的比例和剂量设置

组别	设计过程参数		联用比例			联用剂量/mg·kg ⁻¹				
	C ₁	C ₂	Asp	But	Caf	Asp	+	But	+	Caf
1	1/14	5/14	0.733	0.172	0.095	43.98		3.44		1.90
2	3/14	11/14	0.537	0.099	0.364	32.22		1.98		7.28
3	5/14	3/14	0.402	0.470	0.128	24.12		9.40		2.56
4	7/14	9/14	0.293	0.253	0.454	17.58		5.06		9.08
5	9/14	1/14	0.198	0.745	0.057	11.88		14.90		1.14
6	11/14	7/14	0.114	0.443	0.443	6.84		8.86		8.86
7	13/14	13/14	0.036	0.069	0.895	2.16		1.38		17.90

1.5 配方均匀设计法结果的验证性试验

根据配方均匀设计法求得的预测联用剂量,结合专业知识,确定联用比例和剂量,并用试验加以验证。实验方法和指标同上。

根据可能出现的镇静或兴奋的副反应,选用各种配方观察对小鼠自发性活动的影响,进一步优选配方。采用抖笼换能器法^[9],按文献方法将吊笼用细线固定于横杆与换能器之间,小鼠放入吊笼内适应5 min后,用

和实验室温度为15℃。

1.3 仪器

LMS-2B型二导生理记录仪(成都仪器厂)。桶型吊笼,直径10cm,高7.5cm,重100g。

1.4 镇痛实验方法

采用小鼠甩尾法^[8],记录从光照射开始时至甩尾的时间作为痛阈(即致痛潜伏期),以此作为观察指标。

药物联用定量分析的剂量设置:Asp为主药,最高联用剂量选择人常用镇痛剂量,并折算成小鼠用量约为60mg/kg;But和Caf分别按有效镇静和兴奋剂量(足量),均选用20mg/kg。各剂量组设置根据配方均匀设计表UM^[5,6](表1),设7个剂量组,使各组联用比例相加等于1。

小鼠禁食8h,用筛选基础痛阈为2~4s的动物分组,每组10只,雌雄各半,随机分为7组。用药前测定基础痛阈,然后按表1剂量ig给药,给药容积为每10g体重0.2ml。根据预试结果,在用药1h后再测定痛阈。若痛阈升高超过中断时间(20s),则以20s计算。用自身对照,并据下式计算痛觉反应抑制率(PI, %):PI(%)=(用药后痛阈-用药前痛阈)/照射中断时间。

二导生理记录仪描记小鼠活动曲线。描记小鼠用药前活动曲线后,取出喂药(ig),描记用药1h活动曲线,记录20s内高波(波幅>10mm)的个数(NHW)。分组与给药:小鼠60只,雌雄各半,禁食8h,随机分组,每组10只。

1.6 Asp, But和Caf联用的急性毒性定量实验

小鼠200只,雌雄各半,禁食12h,随机分为20组,每组10只。根据预试验结果,按LD₅₀测定方法设置3

药单用和联用的系列剂量。联用比例根据以上实验确定。观察一次性给药(ig)后7d内各剂量组动物死亡情况。

1.7 数据处理

配方均匀设计分析用逐步回归法建立方程,自编程序计算,偏导数求极值,方程需作置信度检验($P < 0.05$)。组间比较用 t 检验,由 NDST 软件计算。联用分析按参数法^[7]进行,自编程序由计算机分析。

2 结果

2.1 Asp、But 和 Caf 不同比例和剂量联用对小鼠 PI 的影响

表2 Asp、But 和 Caf 联用的剂量(mg/kg)与效应(PI)以及计算变量

Asp / X_1	But / X_2	Caf / X_3	PI/ $\bar{x} \pm s$	平方项和交叉项计算变量						
				X_1^2	X_2^2	X_3^2	$X_1 X_2$	$X_1 X_3$	$X_2 X_3$	$X_1 X_2 X_3$
43.98	3.44	1.90	67.5 ± 17.8	1934.24	11.83	3.61	151.29	83.56	6.54	287.45
32.22	1.98	7.28	58.0 ± 19.6	1038.13	3.92	53.00	63.8	234.56	14.41	464.47
24.12	9.40	2.56	64.5 ± 21.4	581.77	88.36	6.55	226.73	61.75	24.06	580.42
17.58	5.06	9.08	50.5 ± 27.2	309.06	25.60	82.45	88.95	159.63	45.94	807.71
11.88	14.90	1.14	59.5 ± 23.4	141.13	222.01	1.30	177.01	13.54	16.99	201.79
6.84	8.86	8.86	43.0 ± 25.8	46.78	78.50	78.50	60.60	60.60	78.50	536.94
2.16	1.38	17.90	2.5 ± 9.5	4.66	1.90	320.41	2.98	38.66	24.70	53.36

将以上各值代入多元量效方程,得预测药效值。即 Asp 41 + But 14.9 + Caf 1.14 mg/kg 的镇痛反应抑制率为 74%。尚需验证性试验加以验证。根据专业知识:①But 属于镇静剂,大剂量有较强的镇静或催眠作用,故联用剂量不宜过大。该药(X_2)单药的量效曲线分析,显示其最大效应点在 3.44 和 9.40 mg/kg 之间,故取中间值 6.4 mg/kg 作为联用剂量。②由于 Caf 还兼有抵消 But 镇静效应,因此参照文献资料^[4],选用较低的中枢兴奋剂量 5 mg/kg。

Asp 41 + But 6.4 + Caf 5 mg/kg 的预测效应为 70%。其联用比例与国外报道的人用比例(8.1:1.25:1)相近。

2.2 验证性试验结果

根据理论预测方案,Asp 41 mg/kg, But 14.9 mg/kg 和 Caf 1.14 mg/kg 联用镇痛效果最好,与预测效应基本吻合。与溶剂对照组比较,有明显的镇静作用($P < 0.01$)(表 3)。

根据专业知识调整的方案 Asp 41 mg/kg, But 6.4 mg/kg 和 Caf 5 mg/kg 联用镇痛效果也基本符合预测效应,弱于以上方案,但无统计学意义($P > 0.05$),且无明显镇静和兴奋作用(表 3)。

单用 Asp 与溶剂对照组比较,差异有显著性($P < 0.01$)。在联用 But 后效果增加,但与单用 Asp 间无统

7 组的运算变量(剂量)和 PI 数据见表 2。

以 X_1, X_2, X_3 , 及其平方项和交叉项作为自变量,以各剂量组的平均药效为因变量(y),用逐步回归法求得量效多元方程为: $\hat{y} = 48.77 + 1.03 X_1 - 1 \times 10^{-2} X_1^2 - 0.15 X_2^2 - 0.01 X_1 X_3 + 1.39 \times 10^{-3} X_1 X_2 X_3$ 。

经检验 $F = 437.058 > F_{0.05}(5, 1) = 230, P < 0.05$, 说明量效方程可信。以上方程提示:①3 药联用有协同作用。②Caf(X_3)系数多为负值,宜小剂量使用,根据表 2 数据宜选用 1.14 mg/kg。③根据方程,But 选用大剂量较好,宜选用 14.9 mg/kg。④解方程,算得 Asp 具体剂量约为 41.1 mg/kg。

计学差异,且有一定的镇静作用(与溶剂对照组比较 $P < 0.05$)。两药基础上加用 Caf 后,与单用 Asp 相比,效果有显著的统计学差异($P < 0.05$),并且镇静作用消失(与溶剂对照组比较 $P > 0.05$),说明三药联用有协同作用(表 3)。

But 与 Caf 联用效果与溶剂对照组相似($P > 0.05$),说明两药无镇痛作用(表 3),但对 Asp 的镇痛效应起辅助作用。

表3 Asp、But 和 Caf 不同联用方案的确定性试验/ $\bar{x} \pm s, n = 10$

方案	Asp	But	Caf	期望 PI/%	实测 PI/%	自主活动/NHw
1	41	14.9	1.14	74	70.0 ± 16.3	9.9 ± 3.8
2	41	6.4	5.00	70	67.5 ± 18.4	17.4 ± 3.5* ²
3	41	-	-	-	50.0 ± 17.2* ^{1, *3}	15.6 ± 6.1* ²
4	41	6.4	-	-	62.0 ± 18.4	11.6 ± 6.0* ³
5	-	6.4	5.00	-	3.0 ± 11.8* ^{2, *4, *5, *6}	17.2 ± 6.3* ²
溶剂	-	-	-	-	5.5 ± 6.0* ^{2, *4, *5, *6}	16.2 ± 3.0* ^{2, *7}

注:与方案 1 比较,*¹ $P < 0.05$,*² $P < 0.01$;与方案 2 比较,*³ $P < 0.05$,*⁴ $P < 0.01$;与方案 3 比较,*⁵ $P < 0.01$;与方案 4 比较,*⁶ $P < 0.01$,*⁷ $P < 0.05$

2.3 Asp、But 和 Caf 联用急性毒性的定量分析

单用和联用的动物死亡率见表 4。药物联用的参数法^[7]分析表明:Asp、But 和 Caf(8.1:1.25:1)联用的急性毒性,在表 4 的整个联用剂量范围内,均呈相加作

表 4 Asp、But 和 Caf 单用和联用(ig)的剂量和 7d 内死亡率/ n = 10

组别	Asp		But		Caf		联用(8.1:1.25:1)					
	mg·kg ⁻¹	死亡率	mg·kg ⁻¹	死亡率	mg·kg ⁻¹	死亡率	Asp	+	But	+	Caf	死亡率
1	614	0.0	82	0.0	369	0.0	512.9		79.2		63.2	0.0
2	691	0.1	92	0.1	415	0.1	577.0		89.1		71.1	0.1
3	768	0.2	102	0.2	460	0.2	641.1		99.0		79.0	0.2
4	960	0.4	128	0.5	576	0.6	801.4		123.7		98.9	0.4
5	1200	0.9	160	0.8	720	0.8	1001.8		154.6		123.6	0.8
6	1500	1.0	200	1.0	900	1.0	1252.2		193.3		154.5	1.0

用(图 1)。

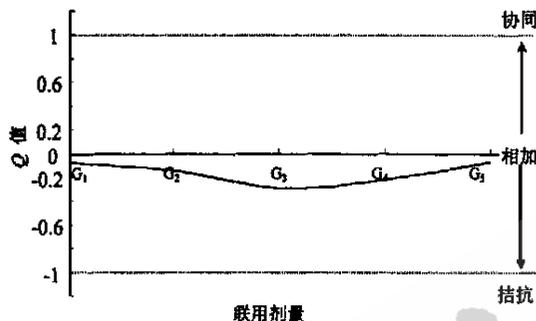


图 1 Asp (A)、But (B) 和 Caf (C) 联用的急性毒性作用的系统分析

G_1 (mg/kg) = A 577 + B 89.1 + C 71.1; G_2 (mg/kg) = A 641.1 + B 99 + C 79; G_3 (mg/kg) = A 801.4 + B 123.7 + C 98.9; G_4 (mg/kg) = A 1001.8 + B 154.6 + C 123.6; G_5 (mg/kg) = A 1252.2 + B 193.3 + C 154.5; 等效标准: $W = 5\%$

3 讨论

均匀设计法由我国方开泰等于 1980 年提出用于导弹实验,现已应用多种领域。均匀设计法对于多因素多水平的分析,优于正交设计。对于本研究,如不考虑重复性试验和验证性试验,如用正交设计法,2 水平需做 49 次试验,3 水平需做 343 次试验,而本研究只需做 7 次。因此均匀设计是一种高效的设计方法。

由于多药物间相互作用的复杂性,往往各药间的效应相互影响,互不独立,配方均匀设计法使各组中各药的联用比例相加等于 1,在理论上本法与一般均匀设计相比,似乎更适合于联用药已知有主辅之分时,按各药重要性大小,分别放入第 1, 2 ...n 列。例如本研究将主药 Ace 放入第 1 列,使之在各组内均匀,其他 2 药为辅药,放入第 2, 3 列,虽分布不甚均匀,使剂量在一定范围内波动,但对结果影响不大。如 3 药作用无主次之分,则不能用此法。

本法求出的量效方程必需经统计学分析,应达到较高的可信度 ($P < 0.05$)。其多元方程的拟合多用逐步回归法,但此法也存在不足,例如,在某个药效水平,

如药效作微小的变化,则拟合结果会出现显著差异。由于生物学试验误差的存在,这种数据处理方法常给两个类似试验的相近数带来截然相反的结果。因此,求出的联用剂量和比例是理论预测值,仅是一条线索,特别是因变量(各组的药效)间方差不齐,标准差较大或变异系数较大时,常需要结合专业知识加以调整。所有理论结果,包括最优化联用比例、剂量、药物间协同与拮抗作用等,均应由进一步的实验证实,即确定性实验。

由于本法各药的水平数较多,分布较为均匀,各联用组最大效应的组往往已接近最优结果。因此,如果量效多元方程信度较低时,可将药效最大的组,视为最优组合。

本研究根据配方均匀设计法的特点,将此法引入多药联用效果定量分析研究,证明其可行性,并限定其应用条件。表明此法只要应用得当,不但获取的信息量大,且实验简便,工作量较小。各药剂量设置时,以足量向下安排成若干水平。同时从药效学和毒理学方面证明:Asp、But 和 Caf 联用比例为 8.1:1.25:1 时,具有合理性,并给出了合适的联用剂量;3 药联用药效协同,从而表明,Caf 在联用中的作用并非仅仅是抵消 But 的副作用。3 药联用毒性未增强(无协同作用)。作者另一研究^[10]应用醋氨酚与 But 和 Caf 联用,结果与本研究完全相同。因此,解热镇痛类药与 But 和 Caf 联用规律值得深入研究。

参考文献

- 1 Elkind AH. Drug abuse and headache. *Medical Clinics of North America*, 1991, 75(3): 727.
- 2 Fialip J, Porteix A, Marty H, et al. Lack of importance of caffeine as an analgesic adjuvant of dipyine in mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1989, 302: 86.
- 3 方开泰. 均匀设计及其应用. *数据统计与管理*, 1994, 13(1): 57.
- 4 方开泰. 均匀设计及其应用. *数据统计与管理*, 1994, 13

- (2): 59 .
- 5 方开泰 . 均匀设计及其应用 . 数据统计与管理 ,1994 ,13 (3): 54 .
- 6 郑青山 ,孙卫民 . 均匀设计法用于多药物联用效果分析 . 中国临床药理学与治疗学杂志 ,1997 ,2: 201 .
- 7 Zheng QS ,Sun RY . Analysis of multidrug effects by parameter method . Acta Pharmacolog Sin ,1998 ,19(3): 232 .
- 8 曾雪玉 ,洪庚辛 . 见 : 陈奇主编 . 中药药理研究方法学 . 北京 : 人民卫生出版社 ,1993: 380 .
- 9 杨秀英 ,李淑仪 . 见 : 陈奇主编 . 中药药理研究方法学 . 北京 : 人民卫生出版社 ,1993: 667 .
- 10 郑青山 ,桂常青 ,孙瑞元 . 醋氨酚、布他比妥和咖啡因联用对小鼠的镇痛作用及急性毒性作用的定量分析 . 中国临床药理学与治疗学杂志 ,1998 ,3(4): 256 .

收稿日期 :1998 - 12 - 01