

基于 Box-Behnken 设计和主成分分析法研究当归-苦参药对的提取工艺及不同比例配伍对急性心肌缺血大鼠的影响

王蕊娇¹, 张育龙¹, 董培良^{2*}, 韩 华^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 优化当归-苦参提取工艺并测定其不同配比的化学成分含量, 研究不同配比药对对急性心肌缺血大鼠的影响。方法 利用 Box-Behnken 设计对当归苦参药对的提取工艺进行考察, 确定最佳提取工艺; 通过 HPLC 法测定当归-苦参药对不同配比 (1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, 0:1) 下的绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藜本内酯、欧当归内酯 A、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、氧化苦参碱、苦参酮 11 种成分的含量; 利用酶标仪进行血清生化指标的检测, 再将药效学指标与化学成分含量用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 法整合, 通过化学和药效 2 个层面综合评价药对的最佳配比。结果 最佳提取工艺为 30 倍量 70%乙醇, 回流提取 3 次, 每次 1 h。与当归-苦参 0:1 比较, 当归-苦参不同配比 (1:1, 2:1, 3:1) 样品中随着当归比例的升高, 苦参中 6 种成分提取量呈“U”型分布; 与当归-苦参 1:0 比较, 当归-苦参不同配比 (1:1, 1:2, 1:3) 样品中随着苦参比例的升高, 当归中 5 种成分提取量亦呈“U”型分布。心肌缺血大鼠各治疗组中当归-苦参 1:2 组疗效最明显, 单味药组改善程度最不明显。结论 研究方法简单可行, 通过化学层面和药效学角度分析两者不同配比的成分变化及对急性心肌缺血大鼠的影响, 可为当归-苦参药对开发为治疗心血管疾病方面的新复方提供理论依据。

关键词: 当归; 苦参; 药对; HPLC; Box-Behnken 设计; 主成分分析; 急性心肌缺血; 绿原酸; 阿魏酸; 洋川芎内酯 I; 藜本内酯; 欧当归内酯 A; 槐果碱; 苦参碱; 氧化槐果碱; 槐定碱; 氧化苦参碱; 苦参酮; 药效学

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)12-3632-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.008

Based on Box-Behnken design and principal component analysis method to explore extraction process of *Angelicae Sinensis Radix-Sophorae Flavescentis Radix* herb pair and effects of different compatibilities on rats with acute myocardial ischemia

WANG Rui-jiao¹, ZHANG Yu-long¹, DONG Pei-liang², HAN Hua¹

1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To optimize the extraction process of the Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*, ASR)-Kushen (*Sophorae Flavescentis Radix*, SFR) herb pair and determine the content of chemical components in different compatibility ratios, and study the effects of different ratios on rats with acute myocardial ischemia in rats. **Methods** The Box-Behnken design was used to investigate the extraction process of ASR-SFR herb pair to determine the best extraction process. The chemical contents of the 11 components in different ratios (1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, 0:1) of ASR-SFR, including chlorogenic acid, fterulic acid, senkyunolide I, ligustilide, levistilide A, sophocarpine, matrine, oxysophocarpine, sophoridine, oxymatrine and kurarinone, were determined by high performance liquid chromatography. The serum biochemical indexes were measured with a microplate reader, and then the pharmacodynamic

收稿日期: 2021-12-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973588); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2020H094)

作者简介: 王蕊娇 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分及其化学。Tel: 18644056368 E-mail: wangruijiao0804@163.com

*通信作者: 韩 华, 硕士生导师, 主要从事中药活性成分及其化学研究。E-mail: hh7551@163.com

董培良, 硕士生导师, 主要从事中药及其复方药效研究。E-mail: tjaliang@163.com

indicators and the content of chemical components were integrated with principal component analysis, and the optimal ratio of herb pairs were comprehensively evaluated through two aspects of chemistry and pharmacodynamics. **Results** The best extraction process was as follow: 30 times amount of 70% ethanol, reflux extraction for three times, 1 h each time. Compared with ASR-SFR with ratio of 0:1, the extracted amounts of the six components of Kushen showed a “U” shaped distribution with increasing the proportion of Danggui in different ratios (1:1, 2:1, 3:1) of ASR-SFR herb pair. And compared with ASR-SFR with ratio of 1:0, the extracted amounts of the five components of Danggui showed a “U” shaped distribution with increasing the proportion of Kushen in different ratios (1:1, 1:2, 1:3) of ASR-SFR herb pair. Among the treatment groups of myocardial ischemia rats, the ASR-SFR herb pair (1:2) group had the most obvious effect, and the improvement degree of the single-drug group was the least obvious. **Conclusion** The method of this study is simple and feasible. Analyzing the changes in the composition of different ratios of ASR-SFR herb pair from the perspective of chemistry and pharmacodynamics can provide a theoretical basis for the development of a new compound for the treatment of cardiovascular diseases.

Key words: *Angelicae Sinensis Radix*; *Sophorae Flavescentis Radix*; herb pair; HPLC; Box-Behnken design; principal component analysis; acute myocardial ischemia; chlorogenic acid; ferulic acid; senkyunolide I; ligustilide; levistilide A; sophocarpine; matrine; oxysophocarpine; sophoridine; oxymatrine; kurarinone; pharmacodynamics

药对是中药配伍中的最小单元, 因其组成简单及具备中药配伍的特点, 成为现代复方研究的主要方向之一^[1]。目前临床上运用的治疗皮肤病的当归苦参丸, 其药方以当归、苦参为药对, 常用当归贝母苦参丸加减方治疗消化系统和心血管系统多种疾病^[2-3]。相关研究发现当归-苦参药对也具有治疗心肌缺血的作用^[4]。研究表明^[5-7], 心肌缺血发生时肌酸激酶 (creatinase kinase, CK)、肌酸激酶同工酶 (creatinase kinase-MB, CK-MB)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 均上调。当归始载《神农本草经》, 性温味甘、辛、苦, 入心、肝、脾经, 为血病之要药^[8], 具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效, 主要化学成分为酚酸类 (阿魏酸、绿原酸等)、内酯类 (藁本内酯、洋川芎内酯、欧当归内酯等)、香豆素和黄酮类、多糖类^[9-10]。苦参始载于《神农本草经》, 味苦、性寒, 入心肝、胃、大肠、膀胱经^[11], 具有清热燥湿、杀虫利尿、消炎、抗心律失常、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等的药理活性^[12-13], 主要化学成分为生物碱类 (苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱和氧化槐果碱等) 和黄酮类^[14-15]。目前, 在国内外对当归-苦参不同配比的化学成分研究以及其治疗心肌缺血的相关研究较少。

Box-Behnken 设计 (Box-Behnken design, BBD) 是一种 3 因素 3 水平设计, 通过多元 2 次方程拟合相关因素与响应值的关系以寻求最佳工艺参数^[16]。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 法是将原有的多个变量降为少数相互独立且具有代表性的综合指标的方法^[17]。目前, BBD 法多用于优化中药单味药、复方等提取工艺, PCA 法多用于中

药材质量分析及评价。本实验首先采用 BBD^[18]对当归-苦参药对的回流提取进行工艺优化, 通过双波长 HPLC 法^[19]对当归-苦参药对不同配伍中绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、氧化苦参碱、苦参酮 11 个成分进行含量测定, 再通过 PCA 法将生化指标 CK、CK-MB、IL-1 β 、IL-6、LDH 等指标与药对化学成分含量整合, 综合各指标评价不同配伍之间的差异, 得出当归-苦参药对的最佳配伍比例, 为当归-苦参药对的配伍特点和临床应用规律、解析以其为基础的复方构成及新的复方开发中提供一定的理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; N-110 型旋转蒸发器, 上海爱朗仪器有限公司; 98-1-B 型电热套, 天津市泰斯特仪器有限公司; AB204-N 型分析天平, 德国 Mettler-Toledo 公司; Epoch 2 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司。

1.2 材料

当归饮片、苦参饮片, 购买于黑龙江中医药大学附属第一医院, 经黑龙江中医药大学中药资源与开发教研室主任王振月教授鉴定, 当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 苦参为豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根。对照品绿原酸、阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A, 中国食品药品检定研究院, 批号 110753-200413、110773-201012、111737-201910、11826-201001; 对照品洋川芎内酯 I, 德思特生物技术有限公司, 批号 94596-28-8; 对照品槐果碱、苦

参碱、氧化槐果碱、槐定碱、氧化苦参碱、苦参酮，成都埃法生物科技有限公司，批号 145572-44-7、110805-200508、26904-64-3、6882-68-4、16837-52-8、34981-26-5，质量分数>98%。乙腈、甲醇为色谱纯，购自北京迈瑞达科技有限公司；实验用水为娃哈哈纯净水，其他试剂均为分析纯。水合氯醛，购于黑龙江省久丰生物工程有限公司；CK、CK-MB、IL-1 β 、IL-6、LDH 试剂盒，购于天津阿尔法生物科技有限公司。

1.3 动物

SD 大鼠购于黑龙江中医药大学药物安全评价中心，实验动物合格证号 SCXK2008-0001；所有大鼠单独关在笼中，在温度为(25 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度为30%~40%的受控标准实验室环境下和12 h的明暗循环，标准饮食，自由进水。所有大鼠均为常规饲养1周。所有动物实验遵循黑龙江中医药大学伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定，均符合3R原则。

2 方法与结果

2.1 当归-苦参药对含量测定方法建立

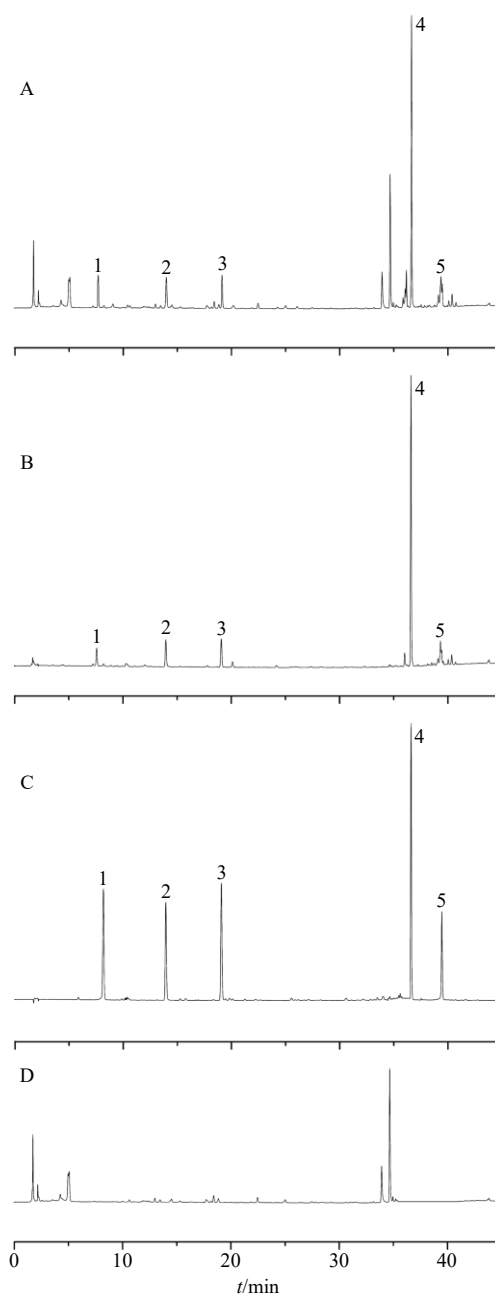
2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量，加甲醇溶解，摇匀，分别定容制成分别含绿原酸40.20 μ g/mL、阿魏酸71.60 μ g/mL、洋川芎内酯I 32.60 μ g/mL、藜本内酯122.40 μ g/mL、欧当归内酯43.20 μ g/mL的混合对照品溶液I和分别含槐果碱74.80 μ g/mL、苦参碱92.60 μ g/mL、氧化槐果碱268.00 μ g/mL、槐定碱62.40 μ g/mL、氧化苦参碱324.00 μ g/mL、苦参酮346.00 μ g/mL的混合对照品溶液II，即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取当归、苦参和当归-苦参1:1，总量各为2 g，将药材分别用10倍量70%乙醇回流提取1 h，浓缩，置于10 mL量瓶中，加甲醇定容至刻度，溶液用0.22 μ m滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为XBridge柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)；检测当归指标流动相为乙腈-0.03%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~20 min, 5%~40%乙腈；20~40 min, 40%~100%乙腈；检测波长280 nm；检测苦参指标流动相为乙腈-0.03%氨水溶液，梯度洗脱：0~20 min, 5%~40%乙腈；20~40 min, 40%~100%乙腈；检测波长220 nm^[20-21]；体积流量1.0 mL/min；柱温30 $^{\circ}$ C；进样量为10 μ L。

2.1.4 专属性实验 精密吸取对照品溶液与供试品

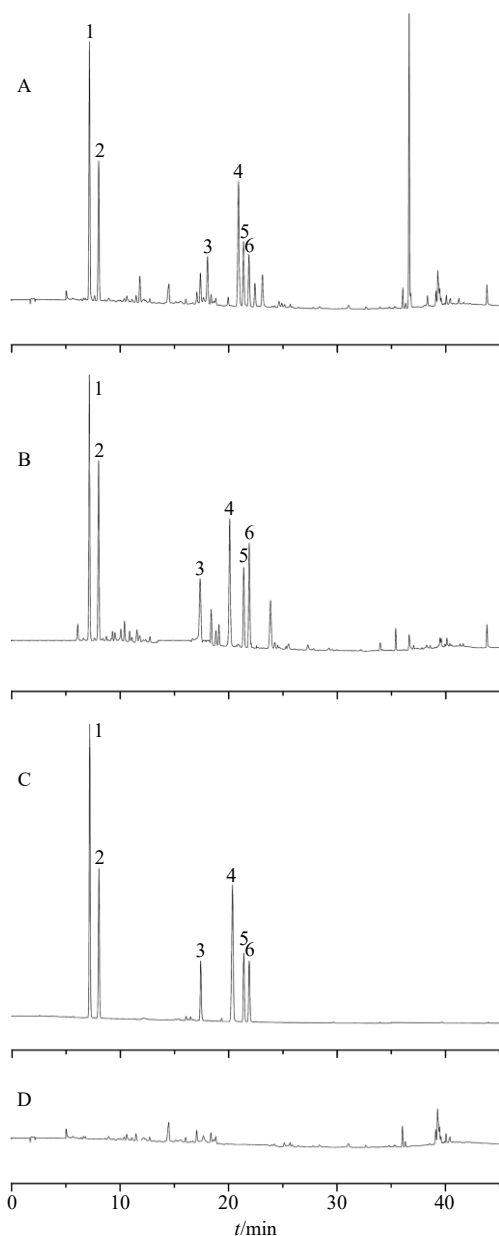
溶液，分别按照“2.1.3”项下色谱条件进样10 μ L测定。分别在当归中检测绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯I、藜本内酯、欧当归内酯A，在苦参中检测氧化苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、苦参酮、槐果碱和苦参碱。色谱图见图1、2。



1-绿原酸 2-阿魏酸 3-洋川芎内酯I 4-藜本内酯 5-欧当归内酯A
1-chlorogenic acid 2-ferulic acid 3-senkyunolide I 4-ligustilide 5-levistilide A

图1 当归-苦参(1:1)样品(A)、当归样品(B)、混合对照品I(C)、苦参样品(D)的HPLC图(280 nm)

Fig. 1 HPLC of ASR-SFR (1:1) sample (A), ASR sample (B), mixed reference substances I (C), and SFR sample (D) (280 nm)



1-氧化苦参碱 2-氧化槐果碱 3-槐定碱 4-苦参酮 5-槐果碱
6-苦参碱
1-oxymatrine 2-oxysophocarpine 3-sophoridine 4-kurarinone
5-sophocarpine 6-matrine

图 2 当归-苦参 (1:1) 样品 (A)、苦参样品 (B)、混合对照品 II (C)、当归样品 (D) 的 HPLC 图 (220 nm)

Fig. 2 HPLC of ASR-SFR (1:1) sample (A), SFR sample (B), mixed reference substances II (C), and ASR sample (D) (220 nm)

2.1.5 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品储备液 120、100、80、60、40、20 μL 至 2 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，得到不同质量浓度水平的对照品溶液。按“2.1.3”项下色谱条件分别进样测定，测得峰面积积分值，以峰面积积分值 (Y) 与对

照品质量浓度 (X) 绘制标准曲线，得回归方程。将混合对照品溶液逐级稀释，以信噪比为 10:1 确定定量限，以信噪比为 3:1 确定检测限。结果见表 1。

2.1.6 精密度试验 取混合对照品溶液 I、II，按照“2.1.3”项下色谱条件进样，连续测定 6 次，测得绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、氧化苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、苦参酮、槐果碱和苦参碱峰面积的 RSD 分别为 0.13%、0.22%、0.22%、1.10%、0.35%、0.13%、0.57%、0.20%、0.86%、0.17%、0.24%，均小于 2%，表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取当归-苦参 1:1 供试品溶液，分别于 0、3、6、9、12、24 h 按“2.1.3”项下色谱条件进样分析，测得绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、氧化苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、苦参酮、槐果碱和苦参碱峰面积的 RSD 分别为 1.6%、1.8%、1.2%、1.3%、1.2%、1.0%、1.4%、1.4%、0.65%、1.2%、1.7%，均小于 2%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 称取当归-苦参 1:1 样品适量，按“2.1.2”项下方法平行制备成供试品溶液，共 6 份，并在“2.1.3”项色谱条件下进样测定。绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、氧化苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、苦参酮、槐果碱和苦参碱质量分数的 RSD 值分别为 1.2%、1.2%、1.3%、1.2%、1.2%、1.7%、1.6%、1.5%、1.6%、1.8%、1.9%，均小于 2%，说明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取当归-苦参 1:1 样品 6 份，每份 0.2 g，分别精密加入对照品溶液适量，按“2.1.2”项下方法平行制备成供试品溶液，并在“2.1.3”项色谱条件下进样测定，计算各成分的平均回收率及其 RSD 值。通过加入等量相同的单一成分测得化学成分含量，绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、氧化苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、苦参酮、槐果碱和苦参碱的平均回收率分别为 98.41%、99.25%、99.25%、98.75%、98.59%、96.18%、98.01%、97.82%、97.52%、97.97%、97.38%，RSD 值分别为 1.2%、1.4%、0.8%、0.96%、0.46%、0.76%、1.46%、0.81%、0.64%、1.2%、1.4%。测得值与理论值基本一致，都符合要求。

2.2 当归-苦参药对的提取工艺优化

2.2.1 BBD 实验设计与结果 根据前期预实验结果分析，运用 Box-Behnken 试验设计原理，选取乙

表 1 线性关系考察结果

Table 1 Linear relation investigation

化合物	回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)	检测限/(μg·mL ⁻¹)
绿原酸	Y=96.070 0 X+6.833 3	0.999 4	0.402 0~2.412 0	0.40	0.12
阿魏酸	Y=202.300 0 X+9.901 0	0.999 4	0.716 0~4.296 0	0.71	0.21
洋川芎内酯 I	Y=680.730 0 X+10.740 0	0.999 1	0.326 0~1.956 0	0.32	0.10
藁本内酯	Y=27.321 0 X+15.160 0	0.999 6	12.240 0~73.440 0	12.24	3.68
欧当归内酯 A	Y=352.070 0 X+3.886 7	0.999 2	0.432 0~2.592 0	0.43	0.13
氧化苦参碱	Y=110.390 0 X+29.727 0	0.999 2	3.240 0~19.440 0	3.24	0.97
氧化槐果碱	Y=67.906 0 X+47.140 0	0.999 1	2.680 0~16.080 0	2.68	0.80
槐定碱	Y=145.820 0 X+3.973 3	0.999 9	0.624 0~3.744 0	0.62	0.19
苦参酮	Y=124.360 0 X+13.420 0	0.999 1	1.730 0~10.380 0	1.73	0.52
槐果碱	Y=112.460 0 X-0.266 7	0.999 3	0.748 0~4.368 0	0.74	0.22
苦参碱	Y=79.602 0 X+0.460 0	0.999 2	0.926 0~5.556 0	0.92	0.28

醇体积分数(A)、提取次数(B)、料液比(C) 3种主要因素为变量,以当归-苦参药对指标成分总量提取率(Y)为响应值设计响应面分析,进行回流提取工艺优化试验。由于提取次数为非连续变量,将提取次数按照总提取时间计算,从而转化为连续变量,即提取1次为总提取时间1h,提取2次为总提取时间2h,提取3次为总提取时间3h^[22],实验设计与结果见表2。

2.2.2 响应面模型建立与方差分析 通过 Design

Expert 12.0 软件综合评分进行线性回归分析,得出拟合方程 $Y=22.31+0.19A-1.71B-0.35C-0.96AB-4.37AC-0.26BC-10.45A^2-1.78B^2-4.63C^2$ 。该模型的方差分析和结果(表3)显示, $R^2=0.9654$,说明模型拟合结果比较理想, F 值为 12.88, $P<0.0001$,说明模型具有显著性差异。其中料液比和提取次数、料液比和乙醇体积分数因素交互影响显著,而提取次数跟乙醇体积分数交互影响不显著。拟合的二次响应面图见图3。根据预测模型得出最

表 2 响应面设计与结果

Table 2 Design and results of response surface

编号	A/%	B/次	C	Y/%	编号	A/%	B/次	C	Y/%	编号	A/%	B/次	C	Y/%
1	90(+1)	1(-1)	1:20(0)	9.23	7	70	2	1:20	25.23	13	90	3	1:20	12.52
2	90	2(0)	1:30(+1)	12.28	8	70	2	1:20	23.34	14	70	1	1:20	8.28
3	50(-1)	2	1:10(-1)	11.59	9	70	3	1:10	16.53	15	70	1	1:30	13.24
4	50	3(+1)	1:20	18.47	10	90	2	1:10	18.21	16	70	2	1:20	19.21
5	70(0)	1	1:10	12.37	11	70	3	1:30	14.32	17	50	2	1:20	21.22
6	50	2	1:30	11.76	12	70	2	1:20	22.56					

表 3 响应面回归模型方差分析

Table 3 Regression model and variance analysis of response surface

来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值
模型	42.15	9	5.29	12.88	<0.000 1	A ²	16.78	1	16.78	9.44	0.018 4
A	0.12	1	0.12	6.884×10 ⁻³	0.001 8	B ²	11.82	1	11.82	0.67	0.440 2
B	22.12	1	22.12	1.25	<0.000 1	C ²	10.51	1	10.51	3.43	0.106 6
C	0.80	1	0.80	0.045	0.003 2	残差	12.61	7	1.76		
AB	2.37	1	2.37	0.13	0.002 4	失拟项	5.83	2	2.92	2.20	0.206 6
AC	17.09	1	17.09	0.97	0.035 8	纯误差	25.78	5	13.16		
BC	0.32	1	0.32	0.018	0.896 2	总和	43.31	16			

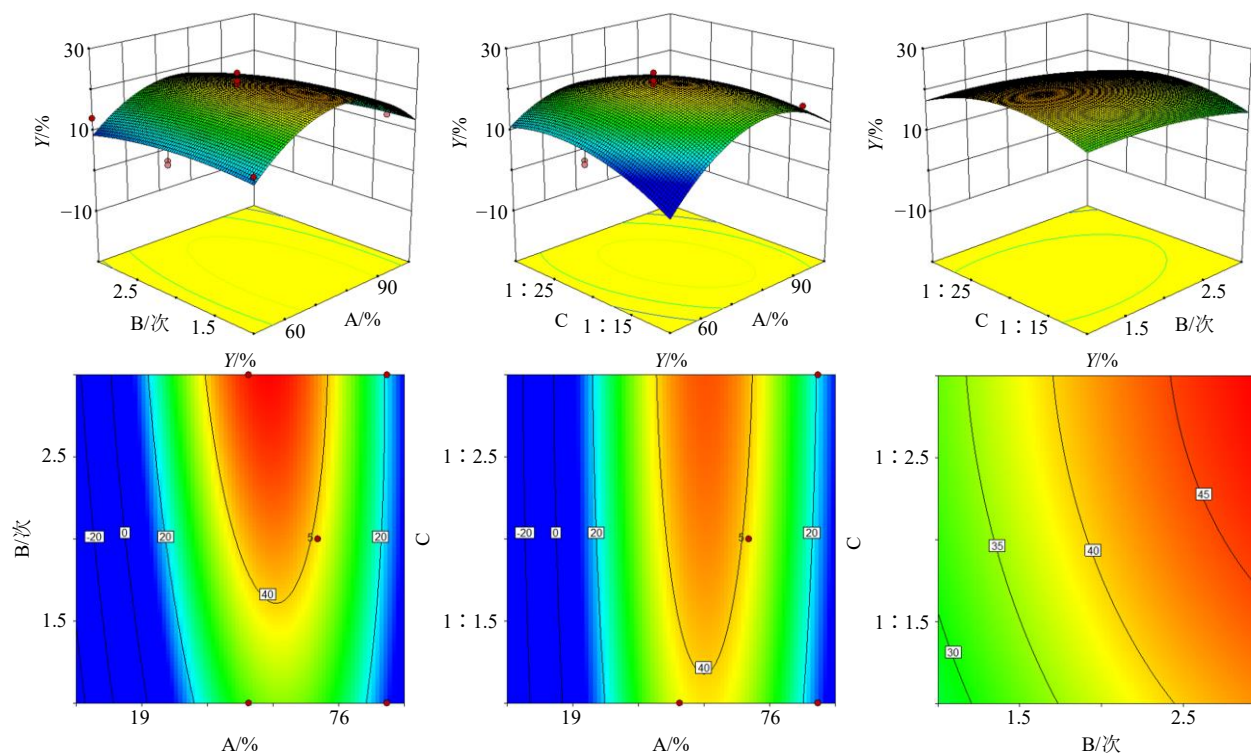


图3 响应面图和等高线图

Fig. 3 Response surface and contour map

佳工艺为料液比 1 : 30, 乙醇体积分数为 70%, 提取次数为 3 次, 每次 1 h, 总提取率 23.24%。为验证该模型的准确性, 在该条件下重复 3 次试验, 得出总提取率为 24.75%, RSD 为 0.24%, 与该模型预测值接近, 说明该条件稳定可行, 具有重复性。

2.2.3 样品含量测定 选取响应面法中的最佳提取工艺来制备当归-苦参不同配伍 (1 : 0、1 : 1、1 : 2、1 : 3、2 : 1、3 : 1、0 : 1), 精密吸取上述供试品溶液, 按照“2.1.3”项下色谱条件进样, 平行测定 3 次, 测得生药中各指标成分的含量。结果见表 4。

表 4 不同配伍比例中当归、苦参指标性成分的 HPLC 含量测定 (n = 3)

Table 4 Determination of index components of ASR and SFR in different ratios by HPLC (n = 3)

当归-苦参	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	绿原酸	阿魏酸	洋川芎内酯 I	藜本内酯	欧当归内酯 A	氧化苦参碱	氧化槐果碱	槐定碱	苦参酮	槐果碱	苦参碱
1 : 0	0.105 8	0.173 9	0.084 4	0.984 4	0.140 9	-	-	-	-	-	-
1 : 1	0.106 4	0.251 3	0.109 9	1.096 0	0.183 8	0.550 4	0.117 1	0.024 0	0.126 2	0.146 1	0.227 1
1 : 2	0.143 8	0.197 4	0.112 1	0.994 2	0.163 1	0.531 3	0.155 4	0.035 4	0.137 8	0.114 5	0.207 6
1 : 3	0.113 9	0.202 2	0.094 4	1.344 6	0.199 4	0.512 4	0.244 1	0.029 1	0.169 2	0.118 8	0.215 3
2 : 1	0.116 5	0.229 2	0.128 3	0.930 6	0.112 1	0.470 7	0.159 6	0.021 6	0.142 6	0.156 5	0.256 2
3 : 1	0.138 2	0.280 5	0.056 6	0.520 5	0.128 1	0.663 1	0.164 1	0.020 4	0.155 1	0.139 7	0.203 8
0 : 1	-	-	-	-	-	0.579 3	0.160 4	0.022 4	0.171 1	0.106 6	0.199 6

“-” 未测出

“-” undetected

2.3 当归-苦参不同配伍改善心肌缺血的研究

SD 大鼠 ip 10%水合氯醛 (3.0 mL/kg) 麻醉, 背位固定, 稳定 15 min。将针形电极插入四肢皮下, 连接多道生理记录仪, 描记肢体 II 导联心电图并以此作为造模前心电图, 供造模后心电图变化分析作参照。

SD 大鼠胸部去毛、消毒, 沿左腋窝至第五肋骨与胸骨连接处切开皮肤约 2 cm, 顺胸浅肌纹钝性分离肌肉层。在第 3、4 肋间打开胸腔, 撕开心包膜, 距左心耳下缘 2 mm 处用 6~0 号眼科缝合线以 0.3~0.5 mm 深度结扎大鼠左前降支, 复位心脏, 迅速缝合

胸腔^[23]。记录缺血后肢体 II 导联心电图,对比造模前心电图,造模后大鼠心电图 ST 段明显上抬,为心肌缺血模型成功标志^[24],如图 4。

将造完模的大鼠随机分成对照组、模型组、当归组、当归-苦参药对不同配伍组(1:1、1:2、1:3、2:1、3:1)、苦参组。按照配伍比例,分别准确称定当归、苦参药材,加入 30 倍量 70%乙醇,回流提取 3 次,每次 1h,滤过,合并滤液,浓缩至提取液无乙醇为止,置于 4℃冰箱,备用。准确按照大鼠给药体积吸取药液并 ig,各药对配比组给予 2.7 g/(kg·d)(生药量),对照组和模型组给予同体积去离子水。于造模第 4 天,连续 ig 给药 7 d。末次药后 1 h,用 5 mL 含肝素钠的真空管腹主动脉采血,于

4℃下 3000 r/min 离心(离心半径 10 cm) 20 min,取上清,分装于 0.5 mL Eppendorf 管中,-80℃冰箱保存,按照试剂盒操作说明对 CK-MB、CK、LDH 等血清酶学和 IL-1β、IL-6 等细胞因子的水平进行检测,结果见表 5。与对照组比较,血清中 CK、CK-M、LDH、IL-1β、IL-6 水平显著升高($P<0.01$),不同配比药对治疗后,血清中 CK、CK-M、LDH、IL-1β、IL-6 水平显著降低($P<0.01$),结果表明当归-苦参药对可以改善心肌受损的情况。

2.4 PCA 法综合评价当归-苦参药对不同配伍对心肌缺血大鼠的影响

将当归-苦参药对化学成分含量测定结果(表 4)和 ELISA 试剂盒测定结果(表 5)用 Excel 2020 软

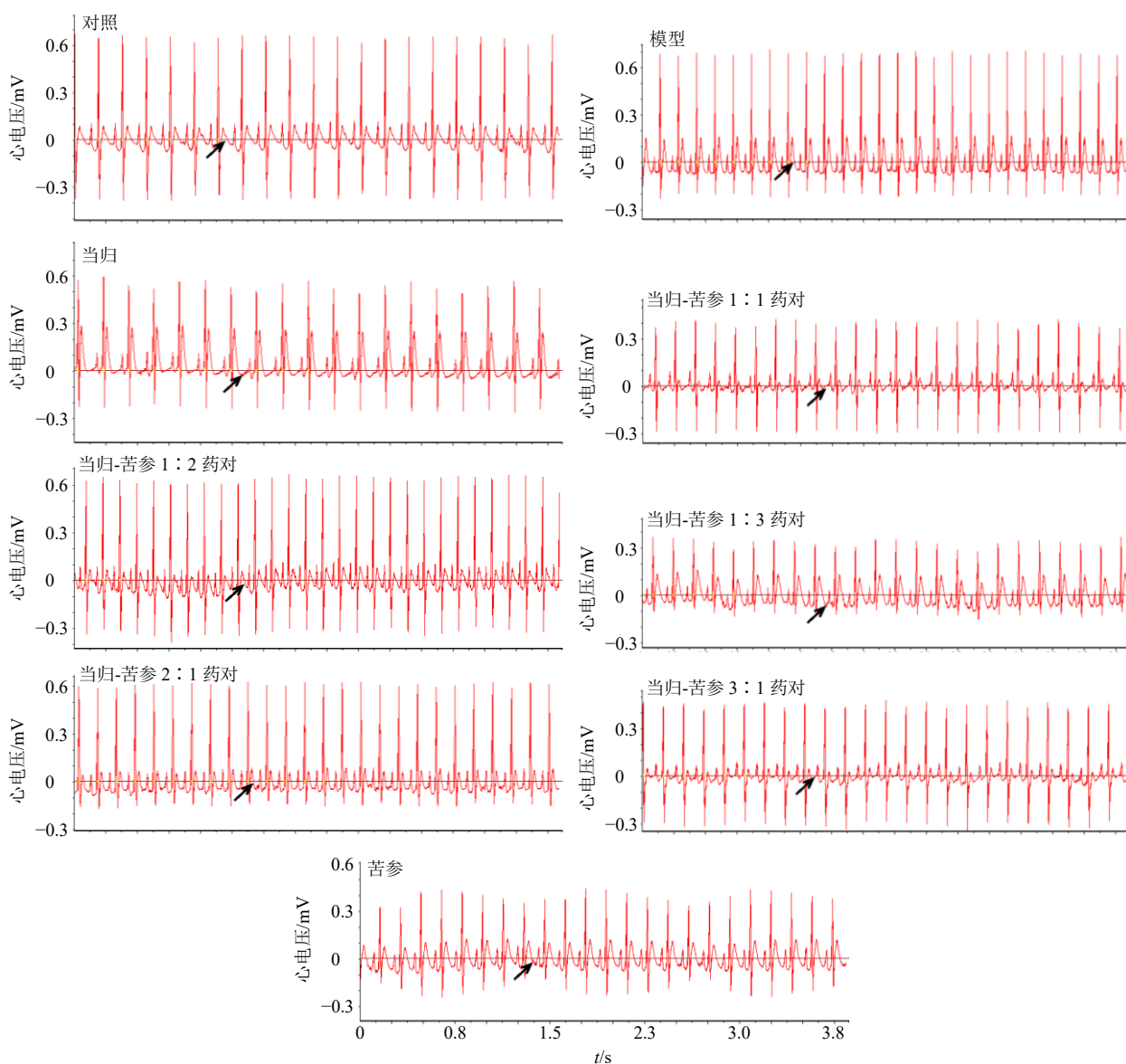


图 4 当归-苦参不同配伍比例样品的心电图

Fig. 4 Electrocardiogram of samples of ASR-SFR with different compatibility ratios

表 5 血清生化指标的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Determination of serum biochemical indexes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	质量浓度/(ng·L ⁻¹)				
		CK	CK-MB	LDH	IL-1β	IL-6
对照	-	936.86±63.86	1.00±0.11	11.42±0.18	22.01±0.95	1.85±0.08
模型	-	2 210.12±122.76**	5.93±0.22**	24.15±0.85**	74.09±3.04**	3.23±0.13**
当归	2.5	1 423.09±132.60###	4.74±0.65###	16.68±0.44###	32.51±1.27###	2.31±0.11###
当归-苦参 1:1 药对	2.5	1 198.52±55.74###	2.77±0.15###	13.81±0.42###	32.87±1.26###	2.01±0.07###
当归-苦参 1:2 药对	2.5	1 489.55±69.29###	3.65±0.49###	13.83±0.66###	36.45±1.50###	2.37±0.10###
当归-苦参 1:3 药对	2.5	1 477.07±67.27###	2.36±0.24###	14.51±0.91###	30.95±2.00###	2.10±0.09###
当归-苦参 2:1 药对	2.5	1 468.73±36.62###	3.07±0.29###	15.31±0.79###	43.25±2.01###	2.62±0.10###
当归-苦参 3:1 药对	2.5	1 960.01±107.57###	3.94±0.21###	17.34±0.84###	41.94±2.09###	2.21±0.09###
苦参	2.5	1 410.56±93.76###	4.38±0.48###	12.96±0.48###	33.82±1.95###	2.00±0.08###

与对照组比较: **P<0.01; 与模型组比较: #P<0.05 ###P<0.01

**P<0.01 vs control group; #P<0.05 ###P<0.01 vs model group

件进行数据统计分析, 采用 SPSS 26.0 软件进行 PCA。

2.4.1 PCA 为详细地阐释当归、苦参单味药和不同配伍 (1:1、1:2、1:3、2:1、3:1) 药对治疗心肌缺血大鼠的差异, 以药对化学成分含量绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、化苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、苦参酮、槐果碱、苦参碱和生化指标 CK、CK-MB、LDH、IL-1β、IL-6 为分析数据源, 应用 SPSS 26.0 对数据进行标准化和 PCA, 见图 5。11 个化学成分和 5 个生化指标变化的 PCA 结果见表 6, 以特征值大于 1 为提取标准, 得到第 1 主成分的特征值和方差贡献率分别为 8.473%和 52.957%, 第 2 主成分的特征值和方差贡献率分别为 3.967%和 24.796%, 第 3 主成分的特征值和方差贡献率分别为 2.242%和 14.010%, 前 3

个成分的累积方差贡献率已达到 91.763%>85%, 因此, 选取前 3 个主成分作为当归苦参药对化学成分含量和生化指标各指标数据分析的有效成分, 它代表了原有 16 个指标变量的 91.763%信息量, 具有很好的代表性。

2.4.2 综合评价模型构建 由表 7 可知, 可以用 3 个变量 Z₁、Z₂、Z₃ 代替原来的 16 个指标对不同配比当归-苦参药对进行药效综合评价^[25-27], 则得出线性组合 (其中 Y₁~Y₁₆ 均为标准化的变量) 分别为 Z₁=0.267 Y₁+0.276 Y₂+0.272 Y₃+0.256 Y₄+0.268 Y₅+0.295 Y₆+0.292 Y₇+0.306 Y₈+0.292 Y₉+0.313 Y₁₀+0.314 Y₁₁-0.082 Y₁₂-0.127 Y₁₃-0.172 Y₁₄-0.147 Y₁₅-0.136 Y₁₆; Z₂=0.138 Y₁+0.126 Y₂+0.071 Y₃+0.093 Y₄+0.119 Y₅+0.076 Y₆+0.100 Y₇+0.079 Y₈+0.070 Y₉+0.063 Y₁₀+0.057 Y₁₁+0.455 Y₁₂+

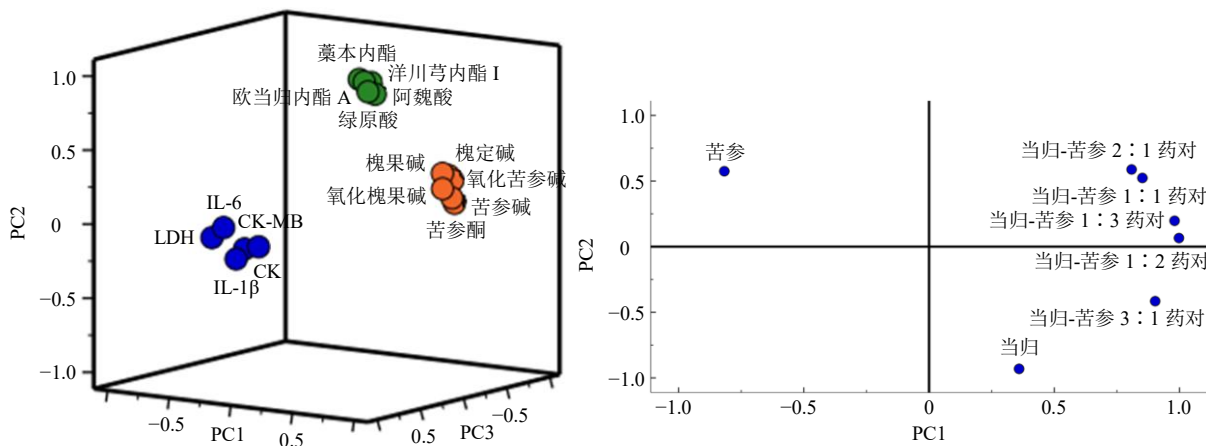


图 5 PCA 载荷图

Fig. 5 Loading plot of PCA

表 6 当归-苦参化学成分和生化指标的特征值和贡献率

Table 6 Characteristic value and contribution rate of chemical constituents and biochemical indexes of ASR and SFR

指标	初始特征值			指标	初始特征值		
	总计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%		总计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
绿原酸	8.473	52.957	52.957	苦参酮	1.864×10^{-15}	1.165×10^{-14}	100.000
阿魏酸	3.967	24.796	77.753	槐果碱	3.692×10^{-16}	2.308×10^{-15}	100.000
洋川芎内酯 I	2.242	14.010	91.763	苦参碱	2.743×10^{-16}	1.714×10^{-15}	100.000
藁本内酯	0.504	3.148	94.911	CK	1.363×10^{-16}	8.517×10^{-16}	100.000
欧当归内酯 A	0.354	2.213	97.124	CK-MB	-1.163×10^{-16}	-7.269×10^{-16}	100.000
氧化苦参碱	0.197	1.231	98.355	LDH	-3.390×10^{-16}	-2.119×10^{-15}	100.000
氧化槐果碱	0.172	1.074	99.429	IL-1 β	-3.998×10^{-16}	-2.498×10^{-15}	100.000
槐定碱	0.091	0.571	100.000	IL-6	-1.584×10^{-15}	-9.903×10^{-15}	100.000

表 7 主成分的载荷系数和特征向量

Table 7 Load coefficients and eigenvectors of principal components

指标	载荷系数			特征向量		
	成分 1	成分 2	成分 3	成分 1	成分 2	成分 3
绿原酸	0.779	0.275	-0.446	-0.050	0.223	0.024
阿魏酸	0.804	0.251	-0.411	-0.038	0.212	0.019
洋川芎内酯 I	0.792	0.142	-0.527	-0.078	0.243	-0.011
藁本内酯	0.745	0.185	-0.581	-0.096	0.261	0.000
欧当归内酯 A	0.780	0.239	-0.529	-0.075	0.249	0.013
氧化苦参碱	0.858	0.151	0.459	0.215	-0.083	0.020
氧化槐果碱	0.849	0.199	0.383	0.194	-0.055	0.029
槐定碱	0.892	0.159	0.283	0.167	-0.021	0.015
苦参酮	0.850	0.140	0.495	0.225	-0.097	0.018
槐果碱	0.911	0.125	0.311	0.175	-0.031	0.007
苦参碱	0.914	0.113	0.350	0.187	-0.045	0.005
CK	-0.239	0.908	0.179	0.074	-0.020	0.232
CKMB	-0.370	0.774	0.089	0.030	-0.008	0.201
LDH	-0.503	0.840	-0.088	-0.030	0.046	0.216
IL-1 β	-0.430	0.861	0.139	0.044	-0.023	0.226
IL-6	-0.397	0.843	-0.095	-0.022	0.057	0.213

$0.388 Y_{13} + 0.421 Y_{14} + 0.432 Y_{15} + 0.423 Y_{16}$; $Z_3 = -0.298 Y_1 - 0.275 Y_2 - 0.352 Y_3 - 0.388 Y_4 - 0.353 Y_5 + 0.307 Y_6 + 0.256 Y_7 + 0.189 Y_8 + 0.331 Y_9 + 0.208 Y_{10} + 0.234 Y_{11} + 0.120 Y_{12} + 0.059 Y_{13} - 0.059 Y_{14} + 0.093 Y_{15} - 0.063 Y_{16}$ 。

取第 1~3 主成分的方差贡献率 α_1 (52.957%)、 α_2 (24.796%)、 α_3 (14.010%) 作为权数, Z_1 、 Z_2 、 Z_3 为特征向量因子, 构建综合评价模型: $F = \alpha_1 Z_1 + \alpha_2 Z_2 + \alpha_3 Z_3$, 即 $F = 0.529 57 Z_1 + 0.247 96 Z_2 + 0.140 10$

Z_3 , 式中 F 值为综合评价指标, 应用该模型结合标准化后的数据计算出当归苦参单味药及其不同配伍治疗心肌缺血大鼠的综合评价 F 。总得分高低反映了当归-苦参药对不同配比中化学成分及生化指标综合影响大小。

从表 8 中可以看出, 随着当归-苦参配比的不断变化, 综合指标 F 值先增大后又逐渐降低, 说明随着当归-苦参配比的变化, 心肌缺血大鼠有不同程度的改善, 其中当归-苦参配比为 1:2 时 F 值达到最高水平, 说明当归-苦参配比为 1:2 对于治疗心肌缺血大鼠的疗效较好。

表 8 当归、苦参单味药及其不同配伍治疗心肌缺血大鼠的综合评价 (F)

Table 8 Comprehensive evaluation of single drug and its different compatibilities of ASR and SFR in treatment of myocardial ischemia in rats (F)

组别	Z_1	Z_2	Z_3	F	排序
当归	-1.89	-0.18	-2.69	-1.422	4
当归-苦参 1:1	2.39	-0.61	-0.62	1.027	6
当归-苦参 1:2	2.42	1.07	-0.17	1.523	1
当归-苦参 1:3	2.37	0.58	-0.43	1.338	7
当归-苦参 2:1	2.28	-0.33	-0.11	1.110	2
当归-苦参 3:1	1.46	1.41	0.71	1.222	3
苦参	-0.44	-1.07	3.07	-0.068	2

3 讨论

本实验通过 Box-Behnken 法优选当归-苦参药对的提取工艺, 其法简单可靠, 首次对当归-苦参药对的提取工艺进行优化, 确定最佳提取条件为料液比 1:30, 乙醇体积分数为 70%, 提取次数为 3 次, 每次 1 h。在最佳提取条件下, 通过双波长 HPLC 法

测定当归-苦参药对不同配比中 11 个化学成分含量,并分析了不同配比下含量的变化。与当归-苦参 0:1 比较,当归-苦参不同配比的(1:1、2:1、3:1)样品中随着当归比例的升高,苦参中 6 种成分提取量呈“U”型分布;与当归-苦参 1:0 比较,当归-苦参不同配比(1:1、1:2、1:3)样品中随着苦参比例的升高,当归中 5 种成分提取量亦呈“U”型分布。且在当归-苦参 1:3 时 11 个成分的含量最高。初步分析当归-苦参配比的升高,可能是通过改变整个溶剂系统的酸碱度和相关成分之间的协同作用,从而促使其不同配比化学成分的变化,具体机理有待进一步深入研究。由此可见,药对的相互配伍对其中的成分的确有一定影响。

本实验通过 PCA 法,将药对有效化学成分含量与血清生化 16 个单一指标进行整合,构建成 3 个独立的综合变量,计算得出当归-苦参各配比的综合指标值,经过加权进行综合评价,得出每一个配比的综合疗效排序。根据当归-苦参 7 个不同配比的综合得分值 F 大小的排序,得出当归-苦参配比为 1:2 时对于心肌缺血大鼠疗效最好,1:3 次之,当归-苦参单位药的改善程度最不明显。

当归-苦参药对在古方中出现频次较高^[28],但其配伍相关的有效成分及治疗心肌缺血的作用机制尚不明确。以上从化学层面和药效学角度多方面分析药对配伍机制,充分说明药对配伍过程中不仅仅是单味药之间简单的加和,而是更为复杂的发生某种小分子化学反应。本实验未考察中药材不同批次以及动物试验中未设阳性药组等问题,以上问题有待于继续深入研究。本实验首次对当归-苦参不同配比的配伍进行化学成分和药效学的研究,通过主成分分析法将单一的指标进行整合,筛选出对于治疗心肌缺血大鼠的最佳配比可能为 1:2,此方法合理可靠,为后续当归-苦参药对在临床的应用奠定了一定的科学依据,对将当归-苦参药对开发为治疗心血管的复方基础具有指导意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王泽凤. 温病学古方中以连翘为核心的药对及其配伍规律探讨 [J]. 山西中医, 2020, 36(1): 45-46.
 [2] 龚小雪, 黄惠刚. 吴光炯教授运用当归贝母苦参丸经验 [J]. 山西中医, 2013, 29(5): 4-5.
 [3] 赵天才, 杨景锋. 《金匱要略》当归贝母苦参丸主治病证探析 [J]. 四川中医, 2009, 27(5): 52-54.

[4] Dong P L, Li H, Yu X J, *et al.* Effect and mechanism of “Danggui-Kushen” herb pair on ischemic heart disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145: 112450.
 [5] 邓悦, 李哲山, 陈声武, 等. 丹花颗粒对实验性急性心肌缺血大鼠炎症机制的研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(5): 1041-1046.
 [6] 栗明, 栗德林, 孟庆刚, 等. 芪玄益心胶囊对糖尿病大鼠急性缺血心肌 NF- κ Bp50、I κ B α 、IL-1 β 及其 mRNA 的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(1): 40-44.
 [7] 王靓, 龙子江, 施慧, 等. 心康注射液对急性心肌缺血模型大鼠治疗作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 69-71.
 [8] 金永志, 李梦帆, 黄荣, 等. 当归补血汤促进血管新生作用的研究进展 [J]. 中医药导报, 2019, 25(13): 109-111.
 [9] 曹颜冬. 当归化学成分及药理作用的分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(2): 93.
 [10] 尹辉. 当归化学成分及药理活性研究进展 [J]. 重庆科技学院学报: 自然科学版, 2015, 17(1): 100-101.
 [11] 张翹, 马悦, 高慧敏, 等. 苦参化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 205-214.
 [12] 张晓雯, 李凌宇, 尚海, 等. 苦参碱及其类似物的结构修饰研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5892-5900.
 [13] Long G Q, Wang D D, Wang J, *et al.* Chemical constituents of *Sophora flavescens* Ait. and cytotoxic activities of two new compounds [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(1): 108-113.
 [14] 孙磊, 郭江玉, 闫彦, 等. 苦参化学成分及其生物碱抑菌活性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(11): 49-53.
 [15] 李早慧. 苦参及其生物碱药理活性研究进展 [J]. 甘肃科技, 2016, 32(1): 132-133.
 [16] 张南生, 孙卫军, 郭虹, 等. Box-Behnken Design 效应面法在制剂处方优化中的应用 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(23): 34-37.
 [17] 许有诚, 赵庄, 卢日刚, 等. 主成分分析在中药质量分析及质量评价中的应用进展 [J]. 大众科技, 2021, 23(8): 37-41.
 [18] 朱叶, 尹德辉, 吴珠, 等. 响应面法优化益智仁总黄酮提取工艺研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1558-1561.
 [19] 骆媯, 潘娉媯, 章建华, 等. HPLC 法同时测定丹参-当归药对中 7 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1689-1696.
 [20] 何元, 顾崇梅, 郭华荣. 不同产地当归药材 HPLC 指纹图谱的建立及 2 种主成分含量测定 [J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(6): 30-35.
 [21] 李华丽, 王小龙, 叶晓娅. HPLC-DAD 法同时测定苦参配方颗粒中 6 种生物碱成分的含量 [J]. 中南药学,

- 2018, 16(5): 687-691.
- [22] 刘艳, 杨炳友, 孙艳, 等. 基于活性和 Plackett-Burman 联合 Box-Behnken 设计的复方栀子金花提取工艺优化 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1363-1367.
- [23] 杨宇杰, 程晓亮, 吕英超, 等. 双氢丹酚酸 B 对大鼠急性心肌缺血的治疗作用 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 447-449.
- [24] 樊连漪. SOX9 在急性心肌梗死中表达变化及意义的相关研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
- [25] 刘伟, 张群, 李志坚, 等. 不同品种黄花菜游离氨基酸组成的主成分分析及聚类分析 [J]. 食品科学, 2019, 40(10): 243-250.
- [26] 付伟, 廖鹏程, 黄天赐, 等. 基于聚类分析及主成分分析的天麻冻干片与传统片质量评价 [J]. 中药材, 2021(5): 1102-1107.
- [27] Yao X H, Shen Y S, Hu R Z, *et al.* The antioxidant activity and composition of the seed oil of mulberry cultivars [J]. *Food Biosci*, 2020, 37: 100709.
- [28] 金益, 尚尔鑫, 叶亮, 等. 当归系列药对的中医应用数据分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 194-199.

[责任编辑 郑礼胜]

• 公益广告 •

