

基于“生物活性-质量标志物”关联的红花等级评价研究

闫亚峰¹, 宋忠兴^{1,5*}, 刘妍如^{1*}, 唐志书^{1*}, 段金殿², 李晓红¹, 陈琳¹, 刘峰³, 许刚³, 朱慧渊⁴

1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083
2. 南京中医药大学 江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023
3. 陕西国际商贸学院, 陕西 西安 712046
4. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712083
5. 陕西兴盛德药业有限责任公司, 陕西 铜川 727031

摘要:目的 关联分析红花质量标志物(Q-marker)羟基红花黄色素A的含量、抗凝血及抗氧化结果,建立一种基于Logistic回归分析的红花饮片等级评价方法。方法 采用超高效液相色谱(UPLC)法测定红花Q-marker羟基红花黄色素A的含量,以凝血酶时间(TT)反映红花的抗凝血活性,以清除羟自由基及DPPH自由基的能力反映红花体外抗氧化活性,运用Logistic回归分析法将含量指标和生物活性指标进行关联分析,最终建立用于红花饮片等级评价的Logistic回归模型。结果 建立的Logistic模型具有良好的稳定性及等级预测能力(训练集及测试集样本的 P 值均大于0.999),将19批红花分为了优、良、中、差4个等级。结论 基于含量测定及生物活性建立的Logistic模型可以用来评价红花饮片质量优劣,为其质量控制提供一定的参考。

关键词: 红花; 质量标志物(Q-marker); 生物活性; 等级评价; Logistic回归分析; 超高效液相色谱法

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)19-4683-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.021

Grade evaluation of *Carthamus tinctorius* based on correlation of “biological activity-quality marker”

YAN Ya-feng¹, SONG Zhong-xing^{1,5}, LIU Yan-ru¹, TANG Zhi-shu¹, DUAN Jin-ao², LI Xiao-hong¹, CHEN Lin¹, LIU Feng³, XU Gang³, ZHU Hui-yuan⁴

1. Shaanxi Province Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research, Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China
2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medical Formula Research, Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization of Jiangsu Province, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
3. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xi'an 712046, China
4. College of Basic Medical, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China
5. Shaanxi Xingshengde Pharmaceutical Ltd., Co., Tongchuan 727031, China

Abstract: Objective To establish a Logistic model for quality assessment of *Carthamus tinctorius* based on content determination and bioactivity. **Methods** A method to determinate hydroxy safflor yellow A by using ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) was proposed. The activity of anticoagulant was reflected by thrombin time (TT) and the anti-oxidant activity was expressed by scavenging ability of hydroxyl radical and DPPH radical. Later, a Logistic model grade evaluation of *C. tinctorius* was constructed based on correlation analysis between content and biological activity Logistic. **Results** The constructed Logistic model had outstanding stability and high prediction accuracy of grades and it divides 19 batches of *C. tinctorius* into four

收稿日期: 2019-08-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81501229); 国家自然科学基金资助项目(81773919); 国家自然科学基金资助项目(81503491); 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-QIN-45); 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2016KTTSSF01-06-01); 陕西省创新人才推进计划青年科技新星项目(2017KJXX-71)

作者简介: 闫亚峰(1995—),女,硕士研究生,研究方向为中药药剂学。Tel: 15709101970 E-mail: 452722757@qq.com

***通信作者** 刘妍如,女,博士,硕士生导师,主要从事药物分析方面的研究。Tel: (029)38182207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

唐志书,男,博士,硕士生导师,主要从事中药制剂制备技术的研究。Tel: (029)38185060 E-mail: tzs6565@163.com

宋忠兴,男,副主任药师,研究方向为中药新药与产业化开发。E-mail: szx74816@sina.com

grades. **Conclusion** The Logistic model based on content determination and biological activity is applicable to assess quality of *C. tinctorius* slices and provides some reference for quality control.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; Q-marker; bioactivity; grade evaluation; Logistic regression analysis; UPLC

红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 始载于《开宝本草》, 主产于我国新疆、河南、浙江、云南等地^[1], 味辛, 性温, 归心、肝经, 作为活血化瘀的代表药, 红花具有活血通经、祛瘀止痛的功效, 常用于治疗冠心病、脑血栓等心脑血管疾病^[2-3]。红花在国内外均有较大的需求量, 然而近年来红花种植受自然环境等因素的影响很大, 多地品种出现杂化退化现象, 致质量控制存在难度, 难以保证相关制剂质量的稳定性^[4]。

中药复杂多样的化学成分给质量控制带来了巨大的挑战。刘昌孝院士等^[5]于 2016 年提出的中药质量标志物 (Q-marker) 概念从质量传递与溯源、成分特有性、成分有效性、复方配伍环境以及成分可测性 5 方面论述了 Q-marker 研究和发现的路径, 给中药质量控制指出了新的研究思路。本课题组前期基于 Q-marker 概念, 建立了脑心通的整体质控方法^[6]。目前对于红花质量标志物的研究主要集中在羟基红花黄色素 A (hydroxy safflor yellow A, HSYA) 上, 如聂欣等^[7]对桃红四物汤 Q-marker 进行预测分析, 提示可将 HSYA 作为红花的 Q-marker。

目前从红花中分离得到的化合物主要包括醌式查耳酮苷类、黄酮类、生物碱类、木脂素类、脂肪酸类等, 其中查耳酮类化合物红花黄色素 (safflor yellow, SY) 为红花的主要活性部位, HSYA 是 SY 的主要有效成分^[8-9]。现代药理学研究表明,

SY 可明显延长大鼠血浆凝血酶时间 (TT)^[10], 因此本实验将 TT 值作为评价红花抗凝血作用的主要指标。另外, 机体内自由基的过多产生具有损伤细胞结构、氧化抗凝血酶等作用^[11], HSYA 分子中的多个酚羟基使其具有较强的清除自由基的能力^[12], 选用羟自由基及 DPPH 自由基清除率作为评价红花抗氧化能力的指标。

本实验将红花 Q-marker HSYA 的含量、TT、羟自由基及 DPPH 自由基清除率作为研究对象, 结合主成分分析 (PCA) 及聚类分析的多元统计分析方法, 对红花饮片进行初步的分类, 进一步通过建立多变量 Logistic 回归模型就所选用的不同来源的红花饮片进行等级评价, 以期为红花投料饮片的质量控制及产地来源的选择提供一定的参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 药材 红花对照药材 (批号 WJPR-GP71), 购于中国食品药品检定研究院; 收集红花饮片 19 批次, 经陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心刘世军副教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 信息见表 1。

1.1.2 试剂 HSYA (批号 MUST-16092910, 质量分数为 99.88%), 购于成都曼思特生物科技有限公司; 乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯, 购于德国 MERK 公司; 羟自由基测试盒 (批号 20190522), 购于南京建成生物工程研究所; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (批号 W27F10E81251), 购于上海源叶生

表 1 红花饮片基本信息

Table 1 Samples information of *C. tinctorius* slices

编号	来源	来源地判定等级	编号	来源	来源地判定等级
S1	河南新乡市安都乡	未分级	S11	新疆兴盛德	未分级
S2	新疆和田策勒县	差	S12	新疆兴盛德	未分级
S3	商丘市农科所	未分级	S13	新疆伊犁	未分级
S4	河南新乡市原阳县	未分级	S14	新疆和田策勒县	优
S5	内蒙古山丹县	未分级	S15	新疆玉门	未分级
S6	四川千方有限公司	未分级	S16	新疆和田策勒县	中
S7	甘肃武威市民勤县	未分级	S17	新疆和田洛浦县	未分级
S8	步长药业有限公司	未分级	S18	甘肃 (统)	统货
S9	新疆吉木萨尔	未分级	S19	中国食品药品检定研究院	未分级
S10	新疆喀什叶城县	未分级			

物科技有限公司; 含枸橼酸钠添加剂一次性真空采血管(批号 181201, 江苏康健医疗用品有限公司); 0.9%氯化钠注射液。

1.1.3 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量(240±10) g, 购于成都达硕实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK(川) 2015-030。饲养环境温度保持在(22±3)℃, 相对湿度为(50±10)%, 自由饮水摄食。

1.2 仪器

超高效液相色谱系统(Waters 公司 ACQUITY UPLC, 包括二元超高压溶剂系统、FTN 自动进样管理器、PDA 检测器和 Empower 3 色谱工作站); 电子分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 酶标仪(美国 Thermo 公司); C2000-A 型全自动凝血分析仪、全自动凝血分析仪测试杯(北京普利生仪器有限公司); Thermo Micro 17R 微量低温冷冻离心机(美国 Thermo 公司); 电热恒温水浴锅(上海科恒实业发展有限公司); FW-1000AD 高速万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限公司); 屈臣氏水。

2 方法与结果

2.1 HSYA 含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 按照《中国药典》2015 年版方法^[13], 取 HSYA 对照品适量, 精密称定, 加 25%甲醇制成含 0.13 mg/mL HSYA 溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 按照《中国药典》2015 年版方法^[13], 取红花粉末(过 3 号筛)约 0.4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 25%甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 300 W, 频率 50 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 25%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1%甲酸-水溶液(A)-乙腈溶液(B), 梯度洗脱程序为 0~2 min, 2% B; 2~20 min, 2%~98% B; 20~25 min, 98% B; 25~27 min, 98%~2% B; 后运行 5 min; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30℃; 检测波长 403 nm; 进样量 2 μL。色谱图见图 1。

2.1.4 系统适应性考察 精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 2 μL, 按“2.1.3”项下色谱方法进

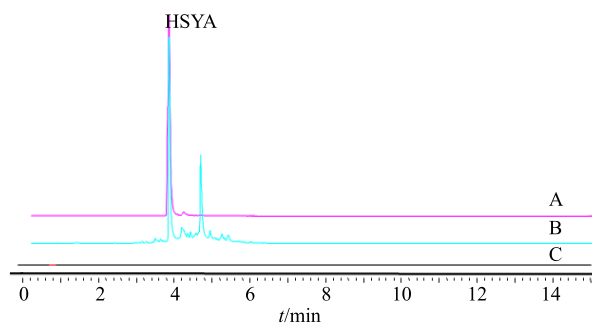


图1 HSYA 对照品(A)、红花样品(B)和空白(C)的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of hydroxysafflor yellow (A), *C. tinctorius* slices (B), and blank samples (C)

行测定, 在此条件下各峰分离度、塔板数参数结果均较好, 因此将此作为固定条件进行样品测定。

2.1.5 检出限(LOD)和定量限(LOQ) 以阴性样品为检测对象, 添加不同体积的 HSYA 对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样, 按照 $S/N=3$ 计算 LOD, 按照 $S/N=10$ 计算 LOQ。本方法 LOD 为 0.63 μg/mL, LOQ 为 4.11 μg/mL。

2.1.6 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件连续测定 6 次, 记录保留时间和峰面积。结果显示对照品的保留时间 RSD 为 0.03%, 峰面积 RSD 为 1.12%。

2.1.7 重复性试验 按“2.1.2”项下供试品制备方法制备 6 份供试品溶液, 精密吸取各供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录保留时间和质量分数。结果显示保留时间 RSD 为 0.22%, 质量分数 RSD 为 1.54%。

2.1.8 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液适量, 分别于室温放置 0、3、6、12、18、24 h, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录保留时间和峰面积。结果显示保留时间 RSD 为 0.28%, 峰面积 RSD 为 1.86%。

2.1.9 加样回收率试验 精密称定已测定指标成分含量的红花样品 3 份, 按照低、中、高 3 个添加水平(80%、100%、120%)进行回收测定, 以“2.1.3”项下色谱条件平行测定 6 次, 记录峰面积并计算加样回收率。结果 3 个水平的平均回收率在 99.23%~101.41%, RSD 小于 2.0%。

2.1.10 样品测定 以“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 以“2.1.3”项下色谱条件平行测定 6 次, 记录峰面积, 按外标法计算各批样品中 HSYA 的平均质量分数, 结果见表 2。

表 2 19 批红花中 HSYA 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Determination results of 19 batches of *C. tinctorius* samples ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

编号	HSYA/(mg·g ⁻¹)	编号	HSYA/(mg·g ⁻¹)
S1	41.44±0.03	S11	23.58±0.02
S2	0.04±0.00	S12	23.05±0.04
S3	44.46±0.04	S13	38.15±0.08
S4	41.80±0.10	S14	19.68±0.07
S5	45.54±0.06	S15	47.99±0.06
S6	38.80±0.03	S16	10.75±0.03
S7	40.04±0.07	S17	30.18±0.05
S8	29.97±0.03	S18	33.15±0.04
S9	34.45±0.03	S19	40.71±0.02
S10	18.17±0.08		

2.2 体外抗凝血的生物活性测定^[14]

2.2.1 血浆制备 准确吸取大鼠腹腔动脉血 9.9 mL, 采用 3.2% 的枸橼酸钠 (全血与抗凝剂比例 9:1) 抗凝, 将血液分装在离心管内, 2 500 r/min, 离心 15 min, 取上清备用。

2.2.2 红花样品的前处理 取红花粉末 (过 3 号筛) 约 2 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 加 0.9% 生理盐水 100 mL, 超声处理 (功率 100 W, 50 kHz) 40 min, 滤过, 将滤液置于蒸发皿中蒸干, 加入 0.9% 生理盐水 5 mL, 超声 20 min, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即得红花提取原液。将原液用 0.9% 生理盐水稀释成质量浓度为 0.120、0.096、0.077、0.061、0.049、0.039、0.031、0.025、0.020、0.016、0.013、0.010 g/mL 的待测液, 备用。

2.2.3 TT 的测定 取血凝仪测试杯, 每通道加入血浆 90 μ L, 分别加入不同质量浓度的待测液 50

μ L, 用全自动血凝仪测定 TT, 为保证测量的准确性, 测定应在 4 h 内完成, 且不可冷冻保存和过度震荡。

2.2.4 量效关系的考察 精密吸取“2.2.2”项下制得的待测液, 按“2.2.3”项下方法测定含药血浆的 TT, 每个质量浓度平行测定 3 次, 结果见表 3 及图 2。

表 3 红花体外对 TT 的第 1 次量效关系考察

Table 3 Inspection of dose-effect relationship on TT *in vitro* for first time of *C. tinctorius* samples

质量浓度/(g·mL ⁻¹)	TT/s		
	1	2	3
0.120	60.22	62.34	61.41
0.096	55.16	57.66	55.63
0.077	51.41	50.47	49.22
0.061	47.19	46.88	48.13
0.049	43.75	42.66	44.53
0.039	40.00	40.94	41.09
0.031	38.44	39.06	39.22
0.025	36.72	37.19	38.59
0.020	35.31	33.59	37.03
0.016	35.31	35.47	35.00
0.013	34.69	34.53	34.22
0.010	33.91	34.69	36.09

根据第 1 次量效关系考察的结果, 选取 0.077、0.061、0.049、0.039、0.031 g/mL 待测液, 按“2.2.3”项下方法测定含药血浆的 TT, 每个质量浓度平行测定 4 次, 进行第 2 次量效关系的考察 (图 2)。

由第 1 次量效关系考察结果可知, 红花质量

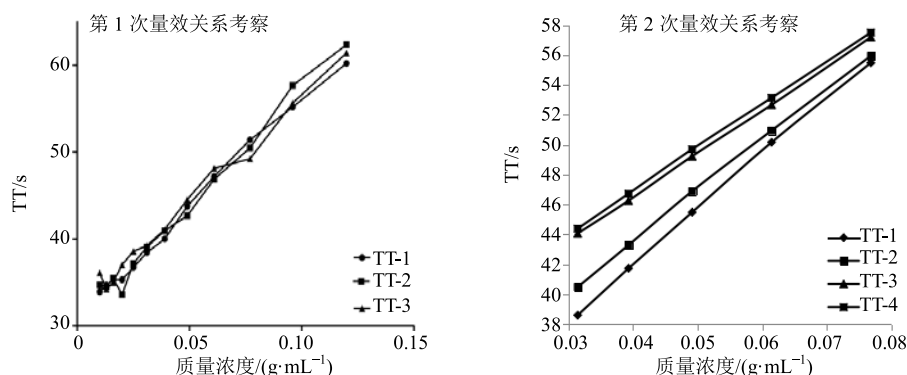


图 2 红花体外对 TT 的量效关系考察

Fig. 2 Inspection of dose-effect relationship on TT *in vitro* of *C. tinctorius* samples

浓度较低时, 体外抗凝血作用不明显, 且不具有剂量依赖性; 当红花质量浓度大于 0.031 g/mL 时, 随着质量浓度的增大, TT 也呈线性延长趋势。由第 2 次量效关系考察结果可知, TT 与 0.031~0.077 g/mL 红花提取液间确存在明显的剂量依赖性, 且 4 次测量结果重复性良好。

2.2.5 线性范围考察 根据量效关系的考察结果, 将红花提取液用 0.9% 生理盐水稀释成质量浓度为 0.077、0.061、0.049、0.039、0.031 g/mL 的溶液, 按“2.2.3”项下方法测定含药血浆的 TT, 每个质量浓度平行测定 4 次, 以药物质量浓度为横坐标 (X), TT 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 线性方程和相关系数见表 4。

表 4 质量浓度与 TT 之间的线性关系考察结果

Table 4 Linearity test results of Mass concentration and TT

线性方程	<i>r</i>
$Y_1=288.94 X+35.365$	0.999 9
$Y_2=289.71 X+34.917$	0.999 9
$Y_3=341.08 X+29.891$	0.999 6
$Y_4=372.88 X+27.029$	0.999 6

由表 4 看出, 红花提取液的质量浓度在 0.031~0.077 g/mL 时, TT 与红花提取液质量浓度间的线性关系良好, 回归方程相关系数均在 0.999 以上。

2.2.6 效价的定义 将质量浓度为 0.049 2 g/mL 的红花溶液使空白血浆的 TT 延长 1 s 定义为 1 个效价单位 (U)。取红花提取原液, 用生理盐水稀释成质量浓度为 0.049 2 g/mL 的标准溶液, 按“2.2.3”项下方法连续测定 6 次, 取平均值作为该批样品的效价。红花的效价=延长凝血酶的时间/(质量浓度×0.05)。各批次红花 TT 效价结果 (图 3-A)。

2.3 DPPH 自由基清除率的测定

参考文献方法^[15], 采用微量法在 96 孔板上进行操作, 取 150 μL 70 % 甲醇, 加入 150 μL 待测液作为空白组; 取 150 μL 70 % 甲醇, 加入 150 μL DPPH 溶液作为对照组; 取 150 μL DPPH 溶液, 加入 150 μL 维生素 C (Vc) 溶液作为标准组; 取 150 μL DPPH 溶液, 加入 150 μL 待测液作为测定组。加样完成后于室温下避光静置 30 min, 用酶标仪测定 517 nm 处的吸光度 (A) 值。每个样品设置 3 个复孔, 重复实验 2 次。根据公式计算红花提取液的 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_s - A_b) / A_c$$

A_s 为测定管的 A 值, A_b 为空白管的 A 值, A_c 为对照管的 A 值

各批次红花 DPPH 自由基平均清除率见图 3-B。

2.4 羟自由基清除率的测定

严格按照羟自由基试剂盒说明书进行操作。每个样品设置 3 个复孔, 重复实验 2 次。根据公式计算红花提取液的羟自由基清除率。

$$\text{羟自由基清除率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) / A_{\text{对照}}$$

各批次红花羟自由基平均清除率见图 3-C。

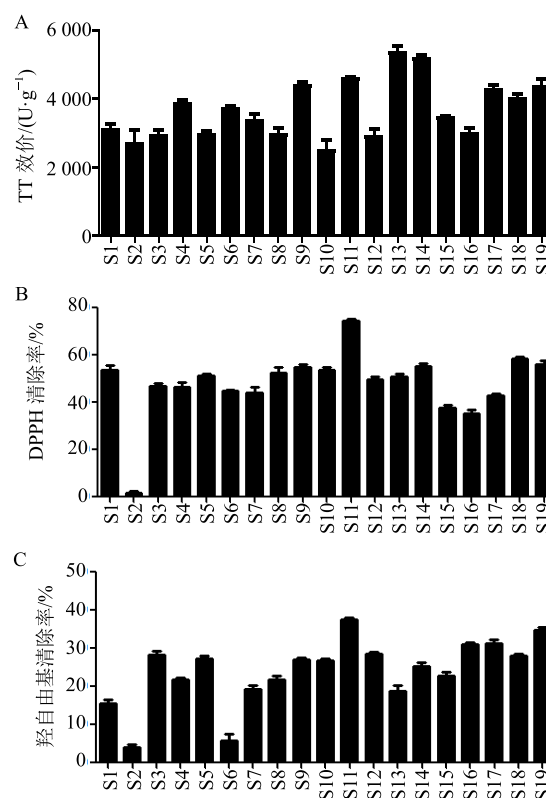


图 3 生物活性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Determination results of bioactivity ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.5 红花投料饮片等级评价

2.5.1 PCA 及聚类分析 PCA 是一种用来掌握主要矛盾的统计方法。其分析过程包括以下步骤: 数据预处理; 计算均值化数据的协方差矩阵; 计算协方差矩阵的特征值和特征向量; 确定主成分的个数。系统聚类分析 (cluster analysis, CA) 又称集群分析, 是按“物以类聚”原则研究事物分类的一种多元统计分析方法, 可以根据样本的多个指标, 定量地确定样本间存在的亲疏关系, 把相似度高的聚合到一个小的分类单位, 相似度低

的聚合到一个大的分类单位,直到把所有的样品聚合完毕,构成分类树状图。

将提取的数据进行对齐、积分、标准化处理后,导入 Simca-p 14.1 软件,以影响因素作为观测值(X)进行 PCA。从得到的数据矩阵中提取携带差异变量最多的主成分。由相关系数矩阵 R 得到特征值、方差贡献率(R^2_Y)和累积方差贡献率。提取前 2 个主成分得到模型拟合度为 84.6%。第 1 主成分(PC1)的贡献率为 60.9%,包含差异信息最多,说明模型拟合能力较好(图 4-A)。以前 2 个主成分建立投影,得到散点图(图 4-B)并

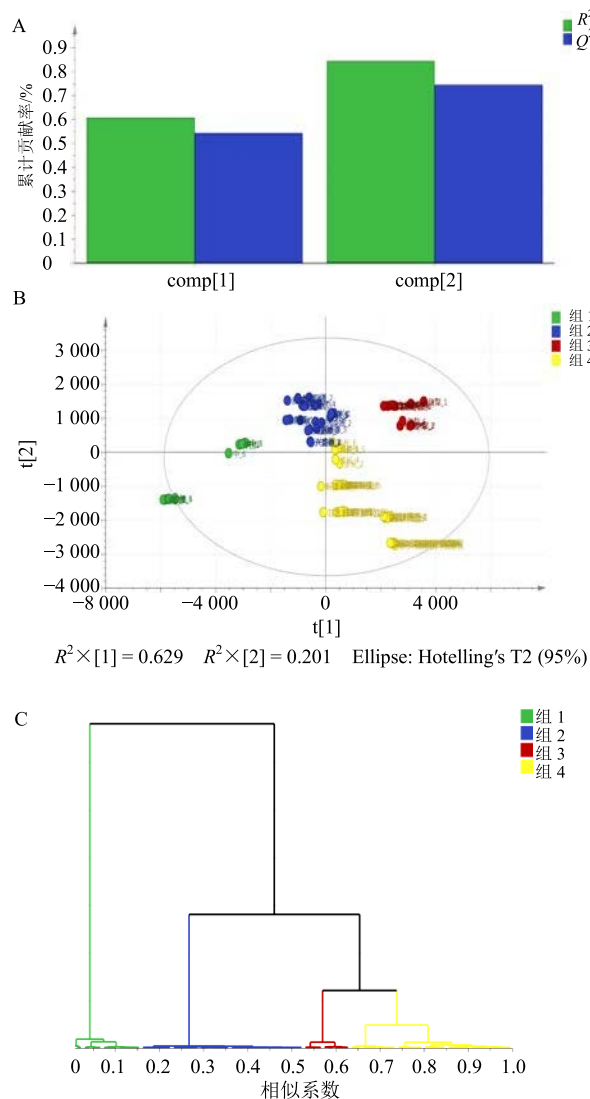


Fig. 4 Results of model prediction, PCA scatter plot, and HCA clustering among 19 batches of samples

对各批数据进行 HCA(图 4-C)。19 批红花样本初步分为优、良、中、差 4 组(组 1~4),结果表明,采用 PCA 的分类分析具有较高的可靠性。

2.5.2 建立多变量 Logistic 回归模型 Logistic 回归分析的目的是建立经验公式,以便由自变量预测因变量概率分布。影响红花投料饮片质量的因素主要分为 2 类:第 1 类是主要成分的含量;第 2 类是生物活性如抗凝血活性、抗氧化活性。由于模式识别模型的建立和参数的确定是由数据驱动,因此,将优、良、中、差分别赋值 4、3、2、1。采用 Logistic 算法建立各样本对应的影响因素(HSYA 含量、TT、DPPH 及羟自由基清除率)与经验等级(响应值)之间的函数关系。将含量测定指标作为确定训练集的主要依据,以 SPSS 软件实现 Logistic 模型参数的求解,得到模型表达式如下:

$$P_{\text{优}} = \exp(-192.110 - 0.205 \times \text{抗氧化}_{\text{DPPH}} + 2.291 \times \text{抗氧化}_{\text{OH}} - 1.952 \times \text{抗凝血}_{\text{TT}} + 6.164 \times \text{HSYA 含量}) / [1 + \exp(-192.110 - 0.205 \times \text{抗氧化}_{\text{DPPH}} + 2.291 \times \text{抗氧化}_{\text{OH}} - 1.952 \times \text{抗凝血}_{\text{TT}} + 6.164 \times \text{HSYA 含量})]$$

$$P_{\text{良}} = \exp(-178.213 + 0.165 \times \text{抗氧化}_{\text{DPPH}} - 4.718 \times \text{抗氧化}_{\text{OH}} + 4.885 \times \text{抗凝血}_{\text{TT}} + 1.126 \times \text{HSYA 含量}) / [1 + \exp(-178.213 + 0.165 \times \text{抗氧化}_{\text{DPPH}} - 4.718 \times \text{抗氧化}_{\text{OH}} + 4.885 \times \text{抗凝血}_{\text{TT}} + 1.126 \times \text{HSYA 含量})]$$

$$P_{\text{中}} = \exp(-132.205 + 0.165 \times \text{抗氧化}_{\text{DPPH}} - 2.038 \times \text{抗氧化}_{\text{OH}} + 0.075 \times \text{抗凝血}_{\text{TT}} - 4.968 \times \text{HSYA 含量}) / [1 + (-132.205 + 0.165 \times \text{抗氧化}_{\text{DPPH}} - 2.038 \times \text{抗氧化}_{\text{OH}} + 0.075 \times \text{抗凝血}_{\text{TT}} - 4.968 \times \text{HSYA 含量})]$$

$$P_{\text{差}} = \exp(-25.641 - 3.315 \times \text{抗氧化}_{\text{DPPH}} + 3.87 \times \text{抗氧化}_{\text{OH}} + 2.027 \times \text{抗凝血}_{\text{TT}} - 0.56 \times \text{HSYA 含量}) / [1 + \exp(-25.641 - 3.315 \times \text{抗氧化}_{\text{DPPH}} + 3.87 \times \text{抗氧化}_{\text{OH}} + 2.027 \times \text{抗凝血}_{\text{TT}} - 0.56 \times \text{HSYA 含量})]$$

将各指标实测值代入上述方程,即可对未参与模型拟合的样本进行等级测试,规定 P 值为 0.9 以上则公式可行,各批次红花等级判断结果见表 5。

Logistic 回归模型对样本的分级结果与 HCA 分类结果基本一致,说明该模型可以较好地反映红花饮片质量等级。

3 讨论

现行标准下测定红花中 HSYA 含量所采用的流动相为甲醇-乙腈-0.7%磷酸溶液^[12]。本实验通过比较不同洗脱溶剂于不同比例下峰的拖尾因子及保留时间,最终将甲醇-乙腈-0.1%甲酸溶液作为流

表 5 不同来源红花等级判断结果

Table 5 Results of grade analysis

编号	P 值	等级	编号	P 值	等级
S1	0.999	优	S11	0.999	中
S2	1.000	优	S12	1.000	中
S3	0.999	优	S13	1.000	中
S4	1.000	优	S14	0.999	中
S5	1.000	优	S15	1.000	中
S6	1.000	优	S16	0.999	中
S7	0.999	优	S17	0.999	差
S8	0.999	良	S18	0.999	差
S9	0.999	良	S19	1.000	差
S10	0.999	中			

动相。参考文献方法^[16], HSYA 对照品溶液进行全波长扫描, 发现在 227 nm 和 403 nm 波长处均有吸收峰, 在 403 nm 波长下的吸光度相对较强, 且供试品在此波长下出峰单一, 专属性强, 故选择 403 nm 作为 HSYA 含量测定的检测波长。

在抗凝血实验中, 为最大程度接近人体环境, 区别于药典的 25% 甲醇采用生理盐水作为提取溶剂。随机选取一批红花以“2.2.2”项下方法进行提取, 稀释为 8 mg/mL 的溶液后取续滤液按“2.1.3”项下色谱方法平行测定 6 次, 测得的 HSYA 的含量与以“2.1.2”项下方法制得的供试品中 HSYA 的含量无统计学差异 ($P>0.05$)。

本研究发现, 红花延长 TT 及清除自由基的能力与 HSYA 含量间不呈单纯的线性关系, 这可能与其所含的复杂化学成分有关^[17]。据报道, 红花中丰富的多糖 (如酞式查耳酮碳苷)、黄酮类化合物、生物碱等都具有一定的抗氧化、抗凝血能力^[18-19], 且不同来源红花所含优势成分因遗传、产地环境、储存条件等因素的差异而不尽相同, 这就要求对红花指纹图谱中的化合物进行进一步的指认, 从而更加明确红花产生抗氧化、抗凝血作用的物质基础^[9]。

值得思考的是, 方药是中医药的一大特色, 复方多组分、多成分的特点使其通过多种途径作用于多个靶点从而协同发挥疗效^[20]。红花使用至今已有 2 500 多年的历史, 其往往与他味药配伍出现, 如记载于宋朝名医陈素庵《素庵医案》中的桃仁红花煎^[21], 清代医学家王清任编撰的《医林改错》中的血府逐瘀汤^[22]等。临床研究也指出, 组方常展现出更优的疗效^[23], 因此, 采用

现代研究思路及方法对红花组方物质基础及药理作用的研究对红花的推广使用更具现实意义。有研究表明, SY 是红花的主要有效成分, 且在其他植物中较少见, 是红花发挥药理作用的物质基础, HSYA 是 SY 中含量较高的成分且具有专属性; 同时, 基于成分可测性的 Q-marker 预测分析指出, 桃红四物汤中 HSYA 含量较高, 可测性强^[24-25]。因此, 将 HSYA 作为红花相关组方的 Q-marker 进行研究可靠性较高。

综上所述, 基于对红花主要有效成分含量、抗凝血及抗氧化作用研究所建立的 Logistic 模型具有良好的等级预测能力, 将 19 批不同来源的红花分为了优、良、中、差 4 个等级。本课题组认为, 甘肃、河南红花在各项指标中表现相对更优, 而传统意义上人们更为青睐的新疆红花在主要成分含量及生物活性等方面均没有表现出特别的优势。本研究为红花饮片质量评价提供了一定的实验数据, 给生产红花相关制剂时投料饮片产地来源的选择提供了一定的参考。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 (第 78 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [2] 王鸿梅. 羟基红花黄色素 A 对心肌梗死大鼠游离脂肪酸、一氧化氮及一氧化氮合酶的影响 [J]. 齐鲁药事, 2009, 28(10): 625-627.
- [3] 朱海波, 王振华, 田京伟, 等. 羟基红花黄色素 A 对实验性脑缺血的保护作用 [J]. 药学学报, 2005, 40(12): 90-92.
- [4] 李彤彤. 红花质量评价和不同花期成分变化研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [5] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [6] 刘妍如, 唐志书, 宋忠兴, 等. 多元统计及“成分-靶点-疾病”在线关联分析脑心通胶囊中质量标志物 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2775-2785.
- [7] 聂欣, 成颜芬, 王琳, 等. 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20191953.
- [8] Chen Y, Chen P D, Bao B H, et al. “Anti-thrombotic and pro-angiogenic effects of *Rubia cordifolia* extract in zebrafish.” [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 12(219): 152-160.
- [9] 施峰, 刘焱文. 红花的化学成分及药理研究进展 [J].

- 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1666-1667.
- [10] 赵金明, 秦文艳, 齐越, 等. 红花黄色素抗凝血作用及对血小板聚集影响的研究 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(6): 30-32.
- [11] 乐世俊, 唐于平, 王林艳, 等. 红花中黄酮类化合物的分离与体外抗氧化研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3295-3300.
- [12] 金鸣, 李金荣, 吴伟. 红花黄色素抗氧化作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 67-69.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [14] 肖珠, 王志斌, 程源, 等. 益心通络胶囊体外抗凝血的生物活性测定法研究 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(3): 20-23.
- [15] 谈利红, 杨宗发, 张丹, 等. 中药抗氧化活性成分及评价方法研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(10): 35-37.
- [16] 张林, 杜守颖, 陆洋, 等. 红花注射制剂有效成分含量测定与 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3528-3533.
- [17] 瞿城, 乐世俊, 林航, 等. 红花化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1872-1877.
- [18] 任丽君, 袁洁, 姚军. 新疆不同产地红花多糖含量测定及抗氧化活性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(2): 229-233.
- [19] Zhou X D, Tang L Y, Xu Y L, *et al.* Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharm*, 2013, 151(1): 27-43.
- [20] 蔡少青, 王璇, 尚明英, 等. 中药“显效理论”或有助于阐释并弘扬中药特色优势 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3435-3443.
- [21] 杨森. 中药方剂桃仁红花煎的计算药理学研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [22] 赵小明. 血府逐瘀汤“异病同治”临床运用 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(4): 53-54.
- [23] 聂惠民. 论《伤寒杂病论》的组方特色与经方创研优势 [J]. 中医杂志, 2006, 47(11): 806-807.
- [24] 扈晓佳, 殷莎, 袁婷婷, 等. 红花的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31(3): 161-168.
- [25] 刘立, 段金廛, 刘培, 等. 桃红四物汤及配伍药对桃仁-红花与四物汤用于原发性痛经作用的比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 2-6.