

基于二分类 Logistic 回归分析的桃仁等级预测研究

李柳柳¹, 刘妍如^{1*}, 颜永刚^{1*}, 唐志书^{1*}, 段金廛³, 宋忠兴¹, 杨莎¹, 刘峰², 陈彦斌², 许刚²

1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省中药产业研究院秦药特色资源研究开发国家重点实验室, 陕西 咸阳 712083

2. 陕西国际商贸学院, 陕西步长制药有限公司, 陕西 咸阳 712083

3. 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

摘要:目的 基于“成分反映活性, 活性指向功效”的中药质量控制研究思路, 建立用于桃仁饮片等级评价的 Logistic 模型。方法 采用二元 Logistic 算法将桃仁饮片苦杏仁苷含量、体外凝血酶时间(TT)、ABTS 清除率、DPPH 清除率和羟自由基清除能力等指标进行关联分析, 建立用于桃仁饮片的等级预测模型, 并进行验证。结果 Logistic 预测模型概率公式将 18 个批次桃仁饮片最终分为以内蒙桃仁为代表的优级、以甘肃桃仁为代表的良级、以步长桃仁为代表的中级和以陕西桃仁为代表的差级 4 个等级, 各批次所对应的预测归属等级明确, 拟合概率 P 值均大于 98%。结论 基于 Logistic 算法并结合“质控成分-体外效价”所建立的分级标准可用于桃仁饮片的等级分类, 且结果准确可靠。

关键词: 桃仁; 等级评价; 生物活性; UPLC-MS; 二元 Logistic 算法

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)19-4691-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.022

Research on grade prediction of *Persicae Semen* based on binary Logistic regression analysis

LI Liu-liu¹, LIU Yan-ru¹, YAN Yong-gang¹, TANG Zhi-shu¹, DUAN Jin-ao³, SONG Zhong-xing¹, YANG Sha¹, LIU Feng², CHEN Yan-bin², XU Gang²

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. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xi'an 712083, China

3. 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

Abstract: Objective A Logistic model for quality evaluation of *Persicae Semen* slices was constructed and its feasibility was verified in this study based on the thoughts on quality control of Chinese materia medica “Components reflect activity and activity points to efficacy”. **Methods** Content of amygdalin, thrombin time (TT), ABTS clearance rate, DPPH inhibition rate, and hydroxyl radical scavenging ability *in vitro* were analyzed by a binary Logistic algorithm. Besides, a grade prediction model for *Persicae Semen* was established and verified. **Results** A total of 18 batches of *Persicae Semen* were divided into four grades: excellent (represented by Neimeng *Persicae Semen*), good (represented by Gansu *Persicae Semen*), medium (represented by Liang *Persicae Semen*), and poor (represented by Shaanxi *Persicae Semen*) according to the probability formula of the Logistic model. All batches of *Persicae Semen* slices were classified accurately, manifested by the high value of fitting probability ($P > 98\%$). **Conclusion** The classification standard based on the Logistic algorithm involving quality control component-*in vitro* titer

收稿日期: 2019-08-06

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(81973592); 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: 李柳柳, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药鉴定学。Tel: 15771809280 E-mail: ab1570961154@163.com

*通信作者 刘妍如(1985—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药物分析。Tel: (029)38182207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com
颜永刚(1978—), 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药品种、品质与资源开发研究工作。E-mail: yunfeng828@163.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

is applicable to *Persicae Semen* slices on the market. Classification results are accurate and reliable.

Key words: *Persicae Semen*; grade evaluation; bioactivity; UPLC-MS; binary Logistic algorithm

桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 或山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch 的干燥成熟种子, 具有活血祛瘀的功效, 主要用于治疗经闭痛经、癥瘕痞块等病症^[1]。近年来, 桃仁的研究中与等级分类相关的较少, 文献调研结果显示, 桃仁活血化瘀功效与其抗氧化、抗凝血的活性有相关性。现有对于其抗凝血机制的研究多集中于抑制血小板聚集、扩张血管、增加器官血流量和促纤溶等方面^[2-3], 对于抗氧化作用的研究仅限于提取部位的活性。对于桃仁体外延长凝血酶时间 (TT) 的研究则未见报道^[4-5]。桃仁饮片品质的优劣与临床疗效息息相关^[6-8], 《中国药典》2015 年版以苦杏仁苷含量作为桃仁主要质控指标, 但蔷薇科植物中大部分都含有苦杏仁苷, 只测定苦杏仁苷含量难免缺乏一定的专属性, 以苦杏仁苷含量高低对市场上的桃仁饮片进行分类可能会具有一定的不准确性^[9]。中药是一个复杂化学体系, 中药的化学物质实体与生命体分子网络的交互作用具有模糊性、难以定量等特点^[10]。本研究对不同批次桃仁饮片苦杏仁苷含量、体外抗凝血和抗氧化效价进行测定, 并通过二元 Logistic 算法建立模型并进行相应的验证, 建立以“Q-marker-体外效价-等级品质”网络为反映体系的分级体制^[10-12], 进而对不同桃仁饮片进行品质评价和等级分类, 以便于临床使用。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱串联 AB SCIEX4500 Qtrap 三重四级杆线性离子阱质谱仪 (美国 Agilent 公司, 美国 AB SCIEX 公司); C2000-A 型全自动凝血分析仪 (北京普利生仪器有限公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器 (昆

山市超声仪器有限公司); Sartorius CPA225D 十万分之一电子分析天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 材料

对照品苦杏仁苷 (批号 K01020CB14, 质量分数 $\geq 98\%$), 购自北京索莱宝科技有限公司; TT 测定试剂盒、全自动凝血分析仪测试杯购自上海长岛生物技术有限公司; ABTS 试剂盒 (101918190320), 购自上海碧云天生物技术有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (批号 W27F10E81251) 购自源叶生物公司; 羟自由基试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。对照药材桃仁 (批号 UERS-LTOB), 购自中国食品药品检定研究院, 样品经陕西中医药大学中药鉴定教研室颜永刚教授鉴定为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 或山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch 的干燥成熟种子 (表 1)。

1.3 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 (240 $\pm$ 10) g, 购于成都达硕实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (川) 2018-030。常规性饲养, 保持温度 (22 $\pm$ 3) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (50 $\pm$ 10) %, 自由饮水摄食。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 供试品溶液的制备 桃仁饮片粉碎为粗粉, 精密称定 0.30 g, 置 150 mL 锥形瓶中, 加入石油醚 (60~90 $^{\circ}\text{C}$) 50 mL 回流 1 h, 趁热滤过并弃去石油醚液。药渣及滤纸挥干后于锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定质量。加热回流 1 h, 放冷称定质量, 用 70% 甲醇补足质量。精密量取续滤液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至

表 1 各批次桃仁信息

Table 1 *Persicae Semen* information for each batch

编号	批次	产地	编号	批次	产地
S1	步长桃仁	陕西步长制药有限公司	S10	桃仁中	安徽亳州药材市场
S2	陕西山桃仁 0709	陕西兴盛德饮片公司	S11	甘肃桃仁	甘肃省平凉市
S3	陕西山桃仁 0501	陕西兴盛德饮片公司	S12	家桃仁甘肃 (选)	甘肃省庆阳市西峰区
S4	陕西桃仁	陕西省咸阳市武功县	S13	家桃仁甘肃 (统)	甘肃省庆阳市西峰区
S5	陕西山桃仁	陕西省渭南市合阳县	S14	甘肃山桃仁	甘肃省平凉市
S6	内蒙桃仁	内蒙呼和浩特	S15	内蒙山桃仁	内蒙古通辽市
S7	山东桃仁	山东省枣庄市	S16	对照山桃仁	中国食品药品检定研究院
S8	桃仁优	安徽亳州药材市场	S17	伪品	安徽亳州药材市场
S9	桃仁良	安徽亳州药材市场	S18	河南山桃仁伪品	河南省濮阳市

刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定苦杏仁苷对照品适量, 加 50% 甲醇制备母液, 并稀释为 0.01、0.2 mg/mL 对照品溶液备用。

2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件 Waters Sunfire™ C₁₈ 柱 (150 mm × 1.5 mm, 5 μm); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积 5 μL ; 体积流量 0.6 mL/min; 流动相为 0.2% 甲酸-水溶液 (A) - 乙腈溶液 (B); 梯度洗脱程序 (后运行 5 min): 0~8 min, 0.2%~100% B; 8~10 min, 100% B; 10~13 min, 100%~0.2% B; 13~15 min, 0.2% B。

2.2.2 质谱条件 一级质谱分析采用 ESI 负离子模式扫描, 检测模式为 Q1 MS 检测模式。离子化参数为离子喷雾电压, 负离子模式 -4 500 V; 雾化气和辅助气为氮气; 离子源温度 450 $^{\circ}\text{C}$, 辅助气 GS1、GS2 压力为 40 psi (275.8 kPa), 气帘气温度 35 $^{\circ}\text{C}$, 离子扫描范围 m/z 100~1 000, 扫描速率 200 s^{-1} 。定量质谱分析采用 ESI 负离子模式进行扫描, 检测模式为多反应检测 (MRM)。标准化合物 MRM 提取离子流谱图 (图 1), 对照品苦杏仁苷的保留时间为 6.98 min, 母离子为 492, 子离子为 161, 去簇电压为 -101.6 eV, 碰撞电压为 -20.9 eV, 碰撞室射出电压为 -13.64 eV。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续测定 6 次。结果显示苦杏仁苷质量分数 RSD 均小于 2%, 表明该方法精密度良好。

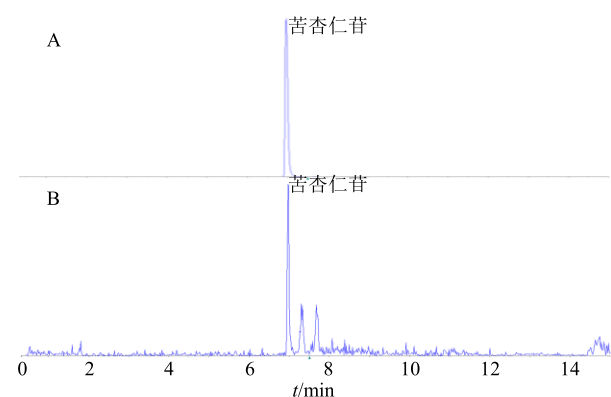


图 1 苦杏仁苷 (A) 和桃仁样品 (B) MRM 提取离子流谱图

Fig. 1 MRM ion extraction flow spectrogram of amygdalin chromatogram (A) and sample chromatogram (B)

2.3.2 重复性试验 精密吸取“2.1.1”项下步长桃仁 (S1) 供试样品, 按“2.2.1”项下色谱条件进样。结果显示苦杏仁苷质量分数 RSD 均小于 3%。

2.3.3 稳定性试验 吸取步长桃仁 (S1) 样品, 按照“2.2.1”项下方法进样 7 次, 计算苦杏仁苷质量分数 RSD。结果表明, 分别间隔 0、4、8、12、16、20、24 h 进样所测得苦杏仁苷质量分数 RSD 均在 0.69%~1.79%, 稳定性良好。

2.3.4 线性回归方程 精密吸取“2.1.2”项下 0.2 mg/mL 苦杏仁苷的对照品溶液 1、3、5、7、9、11 μL , 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以进样量为横坐标 (X)、峰面积的对数值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 所得方程为 $Y = 1 \times 10^6 X + 68\ 737$, $r^2 = 0.999$, 表明线性关系良好, 线性范围 0.20~0.22 mg/mL。

2.3.5 加样回收率试验 吸取步长桃仁 (S1) 0.5 mL 供试品溶液于 3 个量瓶中, 分别加入苦杏仁苷对照品溶液 0.4、0.5、0.6 mL 充分混匀。按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 测得苦杏仁苷平均回收率为 95.4%, RSD 为 0.97%, 表明回收率良好。

2.3.6 定量限 (LOQ) 和检出限 (LOD) 空白样品中加入不同体积的混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 以对照品信噪比 (S/N) 10:1 为 LOQ, 信噪比 (S/N) 3:1 为 LOD。测得 LOQ 为 0.02 mg/mL, LOD 为 6.9 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 含量测定

各批次桃仁饮片按“2.1.1”项下制样方法平行制备 3 份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 运用线性方程计算苦杏仁苷含量。

2.5 桃仁抗凝血活性

参考肖珠等^[13]的 TT 测定方法, 以步长桃仁为标准, 对各批次的体外抗凝血效价进行测定。

2.5.1 血浆制备 大鼠腹主动脉采血, 采用 3.2% 的枸橼酸钠 (全血与抗凝剂比例 9:1) 抗凝, 分装于离心管, 2 500 r/min 离心 15 min, 取血浆备用。

2.5.2 待测样品的制备 精密称定各批次桃仁粗粉适量于具塞锥形瓶中, 加入 8 倍量 65% 乙醇回流 1 h, 滤过, 所得滤液于水浴锅上挥干 (温度不高于 60 $^{\circ}\text{C}$)。精密加入 3 mL 生理盐水溶解, 3 500 r/min 离心 10 min 得桃仁提取原液, 原液用生理盐水逐级稀释, 稀释比例 0.85 (即剂间比 0.85)。

2.5.3 TT 测定 取血凝仪测试杯, 每通道加入血浆 90 μL , 分别加入不同质量浓度的桃仁提取液 50 μL , 测定 TT。

2.5.4 量效考察 用 0.9%生理盐水稀释“2.5.2”项下步长桃仁的待测样品 10 次, 剂间比 0.85, 质量浓度依次为 2.001 7、1.701 4、1.446 2、1.229 3、1.044 9、0.888 2、0.754 9、0.641 7、0.545 4、0.463 6 和 0.394 1 g/mL 。将此 11 个质量浓度水平按照“2.5.3”项下方法进行测定, 每个质量浓度平行测定 3 次 (TT-1~3), 结果见图 2。

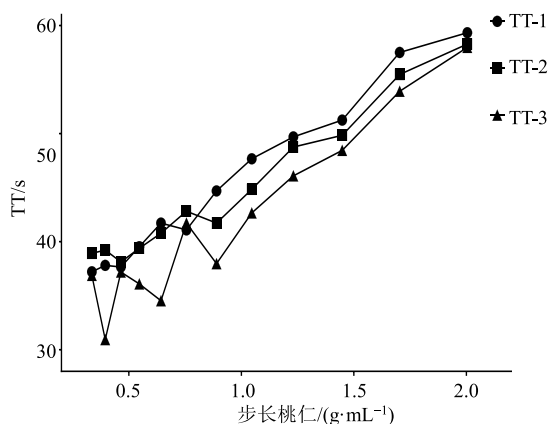


图 2 步长桃仁 (S1) 抗凝血活性量效考察

Fig. 2 Study on dose and effect of *Persicae Semen* with Bu Chang (S1)

由图 2 结果可知, 步长桃仁提取液质量浓度在一定范围内与 TT 作用呈线性关系, 且测定结果的重复性较好。根据第 1 次量效关系考察结果, 将步长桃仁提取液用生理盐水按照剂间比 0.85 稀释共 6 个水平, 按“2.5.3”项下方法测定 TT, 平行测定 3 次。以供试品质量浓度为横坐标 (X), 以抗凝血效价 TT 为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 结果见表 3。步长桃仁的质量浓度在 1.046 30~2.004 37 g/mL , TT 与质量浓度的线性较好。

2.5.5 效价的定义 规定质量浓度为 0.1 g/mL 的提取液 (步长桃仁, S1) 比空白对照 (0.9%生理盐水) TT 每延长 1 s, 作为 1 个效价单位 (U), 连续测定 3 次, 取平均值。则对照品的效价 $= t \times [1/(V \times C)]$ 。其中, t 为浸提液比空白对照延长的时间, V 为浸提液体积, C 为浸提液的质量浓度。

2.5.6 桃仁不同批次饮片 TT 的测定 将 18 批桃仁饮片按“2.5.2”项下方法制备并稀释至质量浓度为 1.448 2 g/mL 的溶液, 按照“2.5.3”项下方法

表 3 桃仁线性范围考察

Table 3 Linear investigation

方程	r
$Y_1 = 22.043 X + 18.073$	0.999
$Y_2 = 22.098 X + 18.044$	0.999
$Y_3 = 23.914 X + 15.425$	0.999

测定各批次桃仁 TT 值, 平行测定 6 次。

2.6 桃仁抗氧化活性

2.6.1 供试品溶液制备 参照“2.1.1”项下方法制备。

2.6.2 抗氧化能力测定 参考谈利红等^[14]的抗氧化活性测定方法, 严格按照试剂盒操作, 测定各批次样品的 ABTS、DPPH 和羟自由基清除率。

2.7 桃仁饮片等级预测

2.7.1 多变量 Logistic 模型建立 令 $Y=1, 2, 3, 4$, 表示桃仁饮片的 4 个等级。令 $q_1=P(y \leq 1)$, $q_2=P(y \leq 2)$, $\dots$, $q_3=P(y \leq 3)$, 常用的 Logistic 回归模型:

$$\ln \frac{q_i}{1-q_i} = \beta_{i0} + \beta_{i1}x_1 + \dots + \beta_{in}x_n$$

β_{i0} 为截距, $i=1, 2, \dots, 4$; $\beta_1, \dots, \beta_n$ 为斜率系数; $x_1, \dots, x_n$ 为自变量

由已有观测值能估计出 $\beta_{i0}, \beta_1, \dots, \beta_n$, 从而桃仁投料饮片各等级的概率 p 表达式如下。

$$p_i = \exp(\beta_{i0} + \beta_{i1}x_1 + \dots + \beta_{in}x_n) / [1 + \exp(\beta_{i0} + \beta_{i1}x_1 + \dots + \beta_{in}x_n)]$$

对于自变量 $x_1, \dots, x_n$, 由方程可以预测 $q_1, \dots, q_3$, 再由 $P(y=1)=q_1$, $P(y=2)=q_2-q_1$, $P(y=3)=q_3-q_2$ 预测桃仁等级概率。

2.7.2 模型拟合 运用二元 Logistic 模型对桃仁饮片的数据进行回归拟合, 等级与测试集: 优级为山东 (S7) 和内蒙桃仁 (S6); 良级为陕西山桃仁 (S5)、陕西 0501 山桃仁 (S3); 中级为甘肃家桃仁选货 (S12)、对照药材 (S16); 差级为陕西 0709 山桃仁 (S2)、河南伪品山桃仁 (S18)、伪品 (S17)。将对应测试集进行拟合, 得出等级概率方程。验证集为步长桃仁 (S1)、内蒙山桃仁 (S15)、甘肃桃仁 (S11)、甘肃山桃仁 (S14)、桃仁优 (S8)、甘肃家桃仁统货 (S13)、桃仁良 (S9)、桃仁中 (S10)、陕西桃仁 (S4) 9 个批次。

所得等级概率公式对测试集进行验证, 各个拟合批次均属于相应等级, 表明结果具有高度稳定性。所得概率公式对验证集进行分类, 分类标

准为 $P \geq 85\%$ 。

3 结果与分析

3.1 桃仁各批次测定结果

桃仁各批次中苦杏仁苷的含量见表 4。由图 3 可知, 各批次苦杏仁苷含量与体外效价测定结果不呈现明显的线性, 即苦杏仁苷含量最高的山东桃仁, 在体外抗凝血和抗氧化测定结果中并非效果最好的批次。这表明苦杏仁苷的含量高低在一定程度上并不能完全表征桃仁品质的优劣。所有批次苦杏仁苷含量均符合《中国药典》2015 年版的规定, 但苦杏仁苷含量差异较大。在体外效价测定中, 各批次体外活性也有一定差异。

表 4 苦杏仁苷含量

Table 4 Amygdalin content

样品批次	苦杏仁苷/(mg·g ⁻¹)
S1	86.15±1.98
S2	55.02±1.39
S3	88.37±1.67
S4	57.40±0.68
S5	92.72±1.54
S6	115.61±1.22
S7	111.34±2.05
S8	83.33±2.12
S9	69.23±0.71
S10	62.98±0.69
S11	81.96±0.76
S12	75.14±2.64
S13	94.68±0.42
S14	97.02±1.76
S15	100.73±1.06
S17	40.25±1.04
S16	77.26±0.83
S18	51.72±1.06

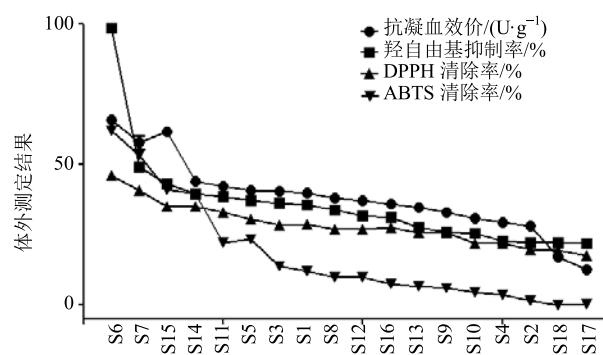


图 3 不同批次桃仁体外效价测定结果

Fig. 3 In vitro titer determination of *Persicae Semen* in different batches

3.2 桃仁饮片等级的预测模型建立

前期测定结果可知, 影响桃仁投料饮片的因素主要分为 2 类。第 1 类是生物活性, 如体外抗

氧化活性、体内抗凝血活性; 第 2 类是主要成分的质控含量。以各个批次数据测定结果作为模式识别的基础, 拟将桃仁不同批次按照优 (I)、良 (II)、中 (III)、差 (IV) 4 个等级分类, 分别赋予响应值 4、3、2、1。

3.2.1 桃仁等级预测 将各个测试集进行模型拟合, 所得等级公式如下:

$$P_{\text{优}} = \exp (19.554 - 65.732 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 0.072 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} + 0.079 \times \text{抗凝血活性}_{\text{TT}} - 0.935 \times \text{苦杏仁苷含量} + 16.889 \times \text{抗氧化活性}_{\text{ABTS}}) / [1 + \exp (19.554 - 65.732 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 0.072 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} + 0.079 \times \text{抗凝血活性}_{\text{TT}} - 0.935 \times \text{苦杏仁苷含量} + 16.889 \times \text{抗氧化活性}_{\text{ABTS}})]$$

$$P_{\text{良}} = \exp (-4516.278 - 486.945 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 2.30 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 1.936 \times \text{抗凝血活性}_{\text{TT}} + 69.954 \times \text{苦杏仁苷含量} - 373.02 \times \text{抗氧化活性}_{\text{ABTS}}) / [1 + \exp (-4516.278 - 486.945 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 2.30 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 1.936 \times \text{抗凝血活性}_{\text{TT}} + 69.954 \times \text{苦杏仁苷含量} - 373.02 \times \text{抗氧化活性}_{\text{ABTS}})]$$

$$P_{\text{中}} = \exp (-551.598 + 268.643 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} + 10.97 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 0.97 \times \text{抗凝血活性}_{\text{TT}} + 13.458 \times \text{苦杏仁苷含量} - 259.945 \times \text{抗氧化活性}_{\text{ABTS}}) / [1 + \exp (-551.598 + 268.643 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} + 10.97 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 0.97 \times \text{抗凝血活性}_{\text{TT}} + 13.458 \times \text{苦杏仁苷含量} - 259.945 \times \text{抗氧化活性}_{\text{ABTS}})]$$

$$P_{\text{差}} = \exp (168.785 - 52.580 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 0.255 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} + 0.142 \times \text{抗凝血活性}_{\text{TT}} - 2.965 \times \text{苦杏仁苷含量} + 14.830 \times \text{抗氧化活性}_{\text{ABTS}}) / [1 + \exp (168.785 - 52.580 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 0.255 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} + 0.142 \times \text{抗凝血活性}_{\text{TT}} - 2.965 \times \text{苦杏仁苷含量} + 14.830 \times \text{抗氧化活性}_{\text{ABTS}})]$$

运用概率公式对验证集进行验证, 所得结果为内蒙山桃仁 (S15) 和甘肃山桃仁 (S14) 归属于优级; 步长桃仁 (S1) 和甘肃桃仁 (S11) 归属于良级; 桃仁优 (S8)、甘肃家桃仁统货 (S13) 和桃仁良 (S9) 归属于中级; 桃仁中 (S10) 和陕西桃仁 (S4) 归属于差级。所有分级 P 值高达 98% 以上, 表明相似率极高。

3.2.2 分级后等级范围 18 个批次桃仁基于预测概率模型分级后, 各级别所对应含量及活性区间见表 5。分析可知, 4 个等级间苦杏仁苷含量、抗凝血活性和抗氧化活性等指标彼此间相关性并不显著, 但同一等级间有大致参数区间, 且各个参数基本符合优 > 良 > 中 > 差。

4 讨论

桃仁具有活血化瘀的功效, 研究发现其对于一些闭塞性的心脑血管疾病具有一定的疗效^[15]。

表5 各等级参数范围

Table 5 Parameter interval of each grade

等级	苦杏仁苷/(mg·g ⁻¹)	抗凝血效价/(U·g ⁻¹)	羟自由基/%	DPPH/%	ABTS/%
优	95.70~119.50	430.00~670.00	39.5~99.0	35.00~47.00	29.80~62.21
良	86.00~95.10	398.00~430.00	35.0~39.0	29.00~34.00	12.00~27.00
中	68.10~83.20	328.00~383.00	26.0~35.0	26.00~28.00	6.00~11.00
差	39.10~63.00	116.00~322.00	22.0~25.8	15.00~22.00	0.20~4.60

目前对于桃仁整体药理活性和新增的临床适应证的研究较多,但对于桃仁活性差异的研究相对较少,且主要集中在桃仁不同提取部位的不同活性的研究上^[5,8,16-18]。目前,将药物主要成分与体外活性相结合的研究方法已成为公认的较全面评价药物品质的方法之一。

在运用 UPLC-MS 测定各个批次桃仁饮片苦杏仁苷含量时,考察了 Agilent 20RBA×Eclipse plus C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 3.5 μm)、Waters Sunfire™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Waters Sunfire™ C₁₈ 柱 (150 mm×1.5 mm, 5 μm) 3 种色谱柱和不同比例流动相 [0.1%、0.2%和 0.3%甲酸-水溶液 (A) -乙腈溶液 (B)] 对峰形和参数的影响。结果表明,当色谱柱为 Waters Sunfire™ C₁₈ 柱 (150 mm×1.5 mm, 5 μm),流动相为 0.2%甲酸-水溶液 (A) -乙腈溶液 (B) 时峰形较好。

测定结果显示,各个批次桃仁苦杏仁苷含量、抗凝血和抗氧化效价间差异较大。仅仅以苦杏仁苷含量并不能有效将不同产地来源的桃仁饮片进行有效的等级分类。本研究中基于“活性成分-体外效价-等级品质”网络体系对不同批次桃仁进行等级划分。在 Logistic 模型回归时,将 18 批桃仁饮片分为测试集和验证集,对所得预测模型准确性进行了考察,等级归属和各个等级间参数范围明确,结果表明预测能力良好。

Q-marker 的核心内容是基于有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍的“五要素”,体现中药成分的专属性、差异性特征,“有效”是质量标志物的核心要素^[19]。本研究首次将桃仁饮片中苦杏仁苷含量与体外效价相关联,并试图通过分析桃仁饮片“成分-体外效价”之间的相关关系,建立桃仁饮片等级分类体系。基于“有效性”来探究苦杏仁苷是否可作为桃仁饮片的 Q-marker,这在一定程度上为桃仁质量控制体系的建立奠定基础。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 林小明. 桃仁化学成分和药理作用研究进展 [J]. 蛇

志, 2007(2): 130-132.

- [3] 以敏. 桃仁改善不同病因所致血液循环障碍的药效及相关分子机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2012.
- [4] 王豪, 涂宗财, 罗亚林, 等. 七种坚果仁中多酚、三萜含量及其抗氧化活性比较 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 201-209.
- [5] 邵海燕, 李兴飞, 陈杭君, 等. 山核桃多酚物质提取及抗氧化研究进展 [J]. 食品科学, 2011, 32(5): 336-341.
- [6] 吴清华, 魏担, 梁颖, 等. 桃仁油质量评价方法研究 [J]. 中药与临床, 2018, 9(5): 5-9.
- [7] 史金凤, 林玉萍, 陈朝银, 等. 核桃仁酚性成分及其生物活性研究进展 [J]. 中成药, 2018, 40(6): 1360-1364.
- [8] 杨玉蓉, 李安平, 钟政昌, 等. 桃仁多肽的酶法制备及其抗氧化活性分析 [J]. 中国粮油学报, 2018, 33(4): 93-100.
- [9] 崔丹丹, 曾令杰, 黄嘉玲, 等. 基于主成分分类和 PLS 回归分析的穿心莲质量等级评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3200-3206.
- [10] 许海玉, 侯文彬, 李珂, 等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 1-8.
- [11] 杨洪军, 许海玉. 整合药理-元胡止痛方的探索 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Hao E, Pang G F, Lai Y H, et al. Peach kernel oil downregulates expression of tissue factor and reduces atherosclerosis in apoE knockout mice [J]. Intern J Mol, 2019, 20(2): 405.
- [16] 房明虎, 吴彦兵, 王俊转, 等. 不同品种核桃仁中脂肪酸含量及组成分析 [J]. 饮料工业, 2019, 22(1): 17-20.
- [17] 黄丽萍, 尹蓉, 张倩茹, 等. 桃仁中脂肪酸、氨基酸含量分析 [J]. 农学学报, 2017, 7(11): 35-41.
- [18] 王凯红, 梁萌萌, 张立伟. 红花注射液体外抗凝血、抗氧化活性初步研究 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2018, 41(2): 413-418.
- [19] 刘昌孝. 发展中药质量标志物 (Q-marker) 理论方法和策略, 研究提升中药科学技术水平 [J]. 药学报, 2019, 54(2): 185-186.