

基于二分类 Logistic 回归分析的桂枝等级预测研究

江大海¹, 刘妍如^{1*}, 王梅^{2*}, 唐志书^{1*}, 宋忠兴¹, 刘峰³, 陈彦斌⁴, 许刚⁴, 陈琳¹, 苏瑞¹

1. 陕西中医药大学, 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)/陕西省中药产业研究院, 陕西 咸阳 712083
2. 陕西中医药大学附属医院 陕西 咸阳 712083
3. 陕西国际商贸学院 陕西 咸阳 712046
4. 陕西步长制药有限公司 陕西 西安 710075

摘要: **目的** 结合质量控制成分和生物活性对桂枝药材质量等级的影响, 建立一种基于“成分-功效”研究思路的二分类模型, 为桂枝的质量分级提供依据。 **方法** 采用超高效液相色谱法(UPLC), 建立质控成分的含量测定方法, 以DPPH和羟自由基清除实验来反映桂枝药材体外抗氧化活性, 采用 Logistic 算法, 将质控指标和抗氧化指标进行关联分析, 最后建立用于桂枝分级的二元 Logistic 回归模型。 **结果** 建立了 20 批桂枝样品的 UPLC 指纹图谱, 并对其抗氧化活性进行测定。采用主成分分析筛选出了 4 个质量控制成分香豆素、桂皮醇、肉桂酸、桂皮醛, 并对其进行方法学验证。根据回归方程, 初步将 20 批桂枝药材分为优、良、中、差 4 级。 **结论** 基于二元 Logistic 回归模型来描述桂枝饮片等级与影响因素之间的映射关系是可行的, 可以更好地表达投料饮片等级分类标准, 为中药桂枝的质量评价标准制定提供了新的思路。

关键词: 桂枝; 质量标志物; 生物活性; UPLC; Logistic 回归; 香豆素; 桂皮醇; 肉桂酸; 桂皮醛

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)19-4697-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.023

Prediction of *Cinnamomum cassia* grade based on binary Logistic regression analysis

JIANG Da-hai¹, LIU Yan-ru¹, WANG Mei², TANG Zhi-shu¹, SONG Zhong-xing¹, LIU Feng³, CHEN Yan-bin⁴, XU Gang⁴, CHEN Lin¹, SU Rui¹

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. The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China
3. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China
4. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710075, China

Abstract: Objective In this study, a two-classification model based on the idea of “ingredient-efficacy” was established for the quality classification of *Cinnamomum cassia* with considerations to quality control components and biological activities. **Methods** A method to determine quality control components was proposed by UPLC. The *in vitro* anti-oxidant activity of *C. cassia* was reflected by DPPH and hydroxyl radical scavenging experiment. The quality control index and anti-oxidant index were correlated by a Logistic algorithm. Finally, a binary logistic regression model for classification of *C. cassia* was established. **Results** UPLC fingerprints of 20 samples of *C. cassia* were established, and their anti-oxidant activities were determined. Four quality control components (coumarin, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, and cinnamaldehyde) were screened out by principal component analysis, and their methodological

收稿日期: 2019-09-03

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); 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-QIN-45); 陕西省“特支计划”青年拔尖人才项目; 陕西省技术创新引导专项(基金)(2018HJCG-21)

作者简介: 江大海, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。Tel: 15249008767 E-mail: 15249008767@163.com

***通信作者** 刘妍如(1985—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为药物分析。Tel: (029)38182207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

王梅, 女, 硕士生导师, 主任药师。Tel: (029)32075608 E-mail: wangm1379@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

validation was carried out. According to the regression equation, 20 batches of *C. cassia* were divided into four grades: excellent, good, medium, and poor. **Conclusion** The binary logistic regression model can describe the mapping relationship between the grade of *C. cassia*. It can better express the classification standard for the prepared *C. cassia*. This study provides a new idea for quality evaluation of *C. cassia*.

Key words: *Cinnamomum cassia* Presl; quality marker (Q-marker); biological activities; UPLC; Logistic regression; coumarin; cinnamyl alcohol; cinnamic acid; cinnamaldehyde

桂枝为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝, 具有发汗解肌、温通经脉、助阳化气、平冲降气之功效, 用于风寒感冒、脘腹冷痛、血寒经闭、关节痹痛、痰饮、水肿、心悸等^[1-2]。桂枝主要活性部位为挥发油, 其有效成分有肉桂酸、桂皮醛、桂皮醇、香豆素及原儿茶酸等。现代药理研究表明桂枝具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、抗过敏、解热镇痛、利尿等作用^[3-5]。桂枝主要分布于广西、广东、云南和福建等地, 由于各地的生态环境条件及药材栽培管理、采收加工方式的不同导致市场上桂枝药材质量的差异较大^[6]。研究表明, 不同来源的桂枝药材中桂皮醛类成分含量变化较大, 《中国药典》2015 年版以桂皮醛的总量不低于 1% 作为桂枝药材质量考察指标, 但仅用其含量控制和评价桂枝药材及其制剂的质量, 难以全面反映其药材质量等级及优劣。目前桂枝药材尚没有统一的等级标准, 难于区分其质量优劣等级, 而中药的真假优劣又直接影响临床用药的安全性和有效性^[7-8], 其质量控制和评价是中药现代化发展的关键科学问题^[9]。因此, 开展桂枝药材等级标准研究, 对桂枝规范化生产和标准化具有十分重要的意义。但如何评级桂枝药材的等级, 迄今为止, 并无具体方法的研究报道。

近些年, 现行中药质量控制的基本模式是参照化学药品质量控制方法建立^[10]。然而, 中药成分十分复杂、药理作用广泛、大部分药效物质基础尚不清楚、大部分作用机制尚不明确, 简单照搬化学药品的质量控制模式的局限性日益凸显^[11]。针对上述难题, 刘昌孝院士等^[12]提出“中药质量标志物 (Q-marker)”的新概念, 对中药指标成分有了新的认识 and 提升。Q-marker 的提出对于桂枝的质量控制和等级分类提供了新的思路。根据研究报道^[13-14], 本实验初步将选定的 4 个成分 (桂皮醛、桂皮醇、肉桂酸、香豆素) 作为桂枝药材质控的 Q-marker, 结合指纹图谱和抗氧化能力的大小, 形成多维度评价体系, 从而实现了对中药质量的控制和科学评价。科学研究表明桂枝有明显的抗氧化能力, 可以有效克服自由基所带来的危害^[15-17]。为了全面评价桂枝

药材质量等级及优劣, 本研究以不同产地的桂枝药材为研究对象, 将传统的药效成分和体外抗氧化等指标相结合, 从桂枝药材的 UPLC 指纹图谱的差异性分析入手, 采用主成分分析 (PCA) 和多因素 Logistic 回归分析模型, 建立了桂枝药材的质量等级快速评价模型, 为桂枝药材等级评价及等级质量标准的制定提供了新思路, 为其他中药材的等级标准制定提供参考。

1 材料与试剂

1.1 材料

桂枝药材主要收集于广东、广西等地, 经陕西中医药大学药学院中药鉴定专业胡本祥教授鉴定为桂枝 *Cinnamomum cassia* Presl, 见表 1。

1.2 仪器与试剂

鑫博得高速万能粉碎机 FW-1000AD, 天津鑫

表 1 不同批次的桂枝药材

Table 1 Different batches of *C. cassia*

批次	品名	产地
S1	桂枝 (优)	广西岑溪市
S2	桂枝 (良)	广西岑溪市
S3	桂枝 (中)	广西岑溪市
S4	桂枝 (差)	广西岑溪市
S5	桂枝尖 (小)	广东河源县
S6	桂枝尖	广西桂平市
S7	桂枝尖	广东河源县
S8	桂枝尖	广西玉林市
S9	桂枝 (大)	广东乐城镇
S10	桂枝	广东宾亨镇
S11	桂枝	广西大全镇
S12	桂枝	广西郁南县
S13	桂枝	广东五和镇
S14	桂枝 (小)	广西通汀镇
S15	桂枝	广西中沙镇
S16	桂枝	广西大官镇
S17	桂枝	广西通汀镇
S18	桂枝 (次)	广西玉林市
S19	桂枝	陕西兴盛德有限公司
S20	桂枝	陕西步长制药有限公司

博得仪器有限公司; Waters Acquity UPLC H-Class System, 配备 Acquity UPLC QSM、Acquity UPLC Sample、Manager FTN、Acquity UPLC PDA Detector 以及 Empower 2 工作站, 美国 Waters 公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; GeneVac miVac 低温离心浓缩仪 (英国 GeneVac 公司); 1510 型全波长酶标仪 (Thermo Fisher Scientific OyRastastie Vantaa Finland 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); YKF-150 型制水机 (杭州华新净水有限公司); DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅 (上海科恒实业发展有限公司)。

对照品桂皮醛 (批号 HC230835198, 质量分数 >98.00%)、桂皮醇 (批号 HC106001198, 质量分数 >98.00%) 均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司; 肉桂酸 (批号 MUST-17031604, 质量分数 >99.99%)、香豆素 (批号 MUST-17040901, 质量分数 >99.99%) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 色谱甲酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 色谱甲醇、乙腈 (霍伟尼尔试剂有限公司); 羟自由基试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20190328); DPPH (批号 W27F10E81251, 源叶生物有限公司); 甲醇 (成都市科隆化学品有限公司, 批号 2018122402); 无水乙醇 (批号 1806073602, 安徽安特食品股份有限公司); 蒸馏水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱条件为 0~10 min, 2%~100% B; 10~13 min, 100%~2% B; 13~20 min, 2% B; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量为 2 μL; 柱温 25 °C; 检测波长 254 nm。

2.2 对照品储备溶液的制备

取桂皮醛、桂皮醇、肉桂酸、香豆素对照品适量, 精密称定, 加入 1:1 的甲醇水分别制成各对照品质量浓度均为 0.5 mg/mL 的对照品储备溶液, 于 4 °C 保存。

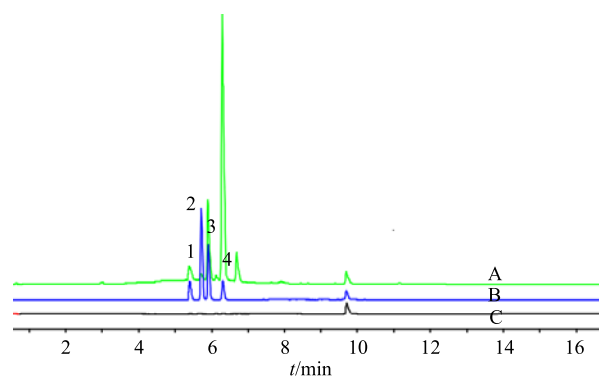
2.3 供试品溶液的制备

取桂枝药材粉末 0.5 g (过 4 号筛), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量,

超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 系统适用性考察

将同批供试品溶液和混合对照品溶液分别进样 2 μL, 记录 254 nm 色谱图。通过比较在线紫外光谱图和保留时间, 桂皮醛、桂皮醇、肉桂酸和香豆素强度适中且与相邻峰分离较好 (图 1)。在此系统条件下, 各峰理论塔板数不低于 8 000。



1-香豆素 2-桂皮醇 3-肉桂酸 4-桂皮醛
1-coumarin 2-cinnamyl alcohol 3-cinnamic acid 4-cinnamaldehyde

图1 桂枝样品 (A)、混合对照品 (B) 和空白 (C) 色谱图
Fig. 1 UPLC chromatograms of *C. cassia* sample (A), mixed standards solution (B) and blank solution (C)

2.5 标准曲线的绘制

分别精密移取混合对照品溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 1:1 的甲醇水溶解至刻度, 摇匀。按“2.1”项下色谱条件分析, 以对照品峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线。香豆素线性范围为 30.0~150.0 μg/mL, 肉桂酸线性范围为 20.0~70.0 μg/mL, 桂皮醇线性范围为 4.0~20.0 μg/mL, 桂皮醛线性范围为 200.0~1 200.0 μg/mL, 表明各对照品在实验质量浓度范围内线性关系良好 (表 2)。

2.6 精密度试验

取同一批 (S12) 桂枝样品, 按“2.3”项下方法制备, 按照“2.1”项色谱条件测定, 连续进样 6 次, 结果各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.36%~0.79%, 相对保留时间的 RSD 为 0.03%~0.07%, 表明仪器精密度良好。

表 2 混合对照品回归方程、相关系数和线性范围

Table 2 Linear equations, correlation coefficients and linear range of mixed standards solution

对照品	回归方程	相关系数	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
香豆素	$Y=2\times 10^7 X-19\ 910$	0.999 7	30.0~150.0
肉桂酸	$Y=4\times 10^7 X+16\ 723$	0.999 6	20.0~70.0
桂皮醇	$Y=8\times 10^7 X-15\ 224$	0.999 6	4.0~20.0
桂皮醛	$Y=1\times 10^7 X-217\ 094$	0.999 9	200.0~1\ 200.0

2.7 重复性试验

取同一批 (S12) 桂枝样品, 按“2.3”项下的方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件测定, 结果各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.22%~0.71%, 相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.02%, 表明方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取同一批 (S12) 桂枝样品, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件测定, 分别在 0、4、8、12、18、24 h 检测指纹图谱, 结果各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.53%~1.35%, 相对保留时间的 RSD 为 0.14%~0.22%, 表明样品稳定性良好。

2.9 桂枝指纹图谱的建立

分别取不同批次桂枝药材, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件测定, 共得到 20 批桂枝样品的 UPLC 指纹图谱, 见图 2。

2.10 含量测定

取 20 种不同批次的桂枝饮片, 每批按“2.3”

项下分别制备 3 份供试品溶液, 精密吸取对照品溶液 2 μL , 供试品溶液 2 μL , 注入液相色谱仪, 测定, 记录峰面积, 计算各批样品中各成分的含量 (表 3)。

2.11 桂枝提取液抑制羟自由基能力检测

将羟自由基试剂盒中的试剂按照说明书方法分别配制应用液及显色剂, 并将应用液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预温 3 min, 样品溶液用蒸馏水稀释成不同质量浓度的待测液, 分别取不同质量浓度的待测液 0.2 mL 进行操作, 确定其最佳稀释倍数。取 40 μL 双

表 3 20 批桂枝样品质控成分含量测定结果

Table 3 Determination of quality control components in 20 batches of *C. cassia*

批次	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	香豆素	桂皮醇	肉桂酸	桂皮醛
S1	3.51	0.75	1.77	56.26
S2	2.96	0.53	2.09	37.38
S3	3.25	0.62	1.91	49.06
S4	2.74	0.36	1.77	27.57
S5	4.23	0.38	1.75	60.82
S6	2.11	0.23	1.33	33.22
S7	3.06	0.32	2.68	51.03
S8	3.69	0.63	1.76	54.32
S9	2.97	0.56	1.95	44.67
S10	4.40	0.61	1.84	54.41
S11	2.94	0.42	1.63	33.93
S12	1.44	0.26	1.62	19.69
S13	3.75	0.71	2.12	60.32
S14	3.04	0.25	1.86	39.96
S15	2.81	0.25	1.39	23.55
S16	3.22	0.43	1.75	42.06
S17	1.80	0.21	2.15	32.84
S18	2.02	0.51	2.10	26.91
S19	3.58	0.49	2.15	55.28
S20	2.21	0.36	2.14	24.97

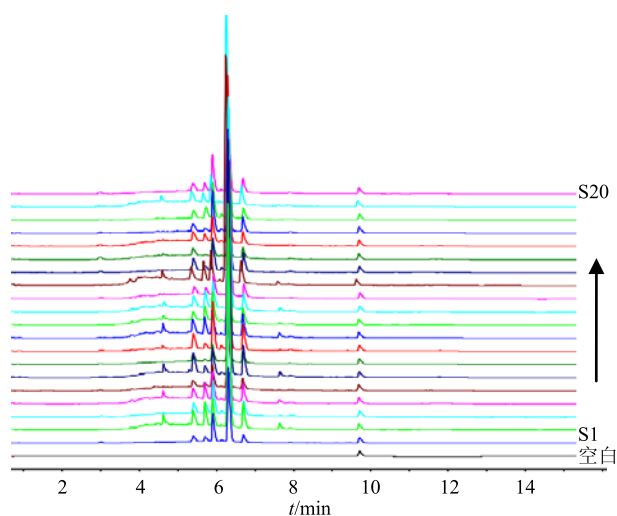


图 2 254 nm 波长下 20 个批次桂枝饮片 UPLC 图谱

Fig. 2 UPLC fingerprints of 20 batches of *C. cassia* at 254 nm

蒸水加入 40 μL 硫酸亚铁应用液作为空白组；取 20 μL 双蒸水和 20 μL H_2O_2 标准应用液加入 40 μL 试剂三应用液作为标准组；取 20 μL 双蒸水和 20 μL 底物应用液加入 40 μL 硫酸亚铁应用液作为对照组；取 20 μL 待测样品溶液和 20 μL 底物应用液加入 40 μL 硫酸亚铁应用液作为测定组。混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 min 后，各组均加入 200 μL 显色剂。用酶标仪测定 550 nm 处的吸光度 (A)，根据公式计算各批次桂枝抑制羟自由基的能力。结果见表 4。

抑制自由基能力 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{待测}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 8.824 \times 5 \times$
样品稀释倍数

2.12 桂枝提取液清除 DPPH 自由基能力检测

用甲醇配制 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液，避光保存备用，另配制 2.0 mg/mL 的维生素 C (Vc) 溶液备用，操作方法根据文献稍做修改^[18]，取 150 μL 甲醇，加入 150 μL 待测液作为空白组；取 150 μL 甲醇，加入 150 μL DPPH 溶液作为对照组；取 150 μL DPPH 溶液，加入 150 μL Vc 溶液作为标准组；取 150 μL DPPH 溶液，加入 150 μL 待测液作为样品待测组。实验采用微量法进行加样，室温下避光静置 30 min，用酶标仪测定 517 nm 处的 A 值。计算 DPPH 自由基清除率。

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

A_s 为样品溶液的 A 值， A_b 为空白管的 A 值， A_c 对照管的 A 值

表 4 20 批桂枝样品 DPPH 和羟自由基抑制率

Table 4 DPPH and hydroxyl radical inhibition rate of 20 batches of *C. cassia*

批次	DPPH 清除率/%	羟自由基抑制率/%
S1	64.47	87.09
S2	20.82	36.09
S3	90.63	28.31
S4	59.61	51.43
S5	61.40	65.48
S6	84.98	94.17
S7	62.16	56.88
S8	70.95	80.09
S9	90.53	70.16
S10	84.98	94.17
S11	59.73	8.65
S12	70.29	16.31
S13	57.14	95.10
S14	55.14	85.10
S15	49.41	23.94
S16	69.64	45.57
S17	72.99	58.71
S18	60.77	14.36
S19	79.51	82.96
S20	38.42	48.02

3 指纹图谱的相似度评价

采用国家药典委员会“中药色谱特征图谱相似度评价系统软件”(2012 版 A)，以指纹图谱共有模式为对照，计算 20 批桂枝样品的相似度，结果见表 5。结果表明，各批次桂枝样品的质量相对稳定。

表 5 20 批样品相似度分析结果

Table 5 Similarity of common peaks for 20 batches of samples

批次	相似度	批次	相似度
S1	0.997	S11	0.996
S2	0.998	S12	0.983
S3	0.995	S13	0.986
S4	0.968	S14	0.995
S5	0.996	S15	0.982
S6	0.995	S16	0.998
S7	0.996	S17	0.991
S8	0.997	S18	0.984
S9	0.994	S19	0.997
S10	0.997	S20	0.985

4 等级划分方法

分别选择桂枝饮片分类标准生成的数据以及实例数据作为样本，采用 PCA 法对样本数据进行降维处理，以 Logistic 回归模型来描述桂枝质量影响因素与桂枝饮片规格等级之间的对应关系，建立主成分-Logistic 回归模型。从模型的通用性和实用性考虑，具有一定数学表达式的模型更易于被理解和应用，其只需将实际数据输入数学表达式中即可计算出预测结果。为了建立简单实用的桂枝投料饮片预测模型，研究结合 PCA 和 Logistic 回归模型来描述桂枝投料饮片等级与影响因素之间的映射关系，建立桂枝投料饮片预测的数学表达式。根据数据样本的不同，该模型可以实现桂枝投料饮片分类标准的数学表达。

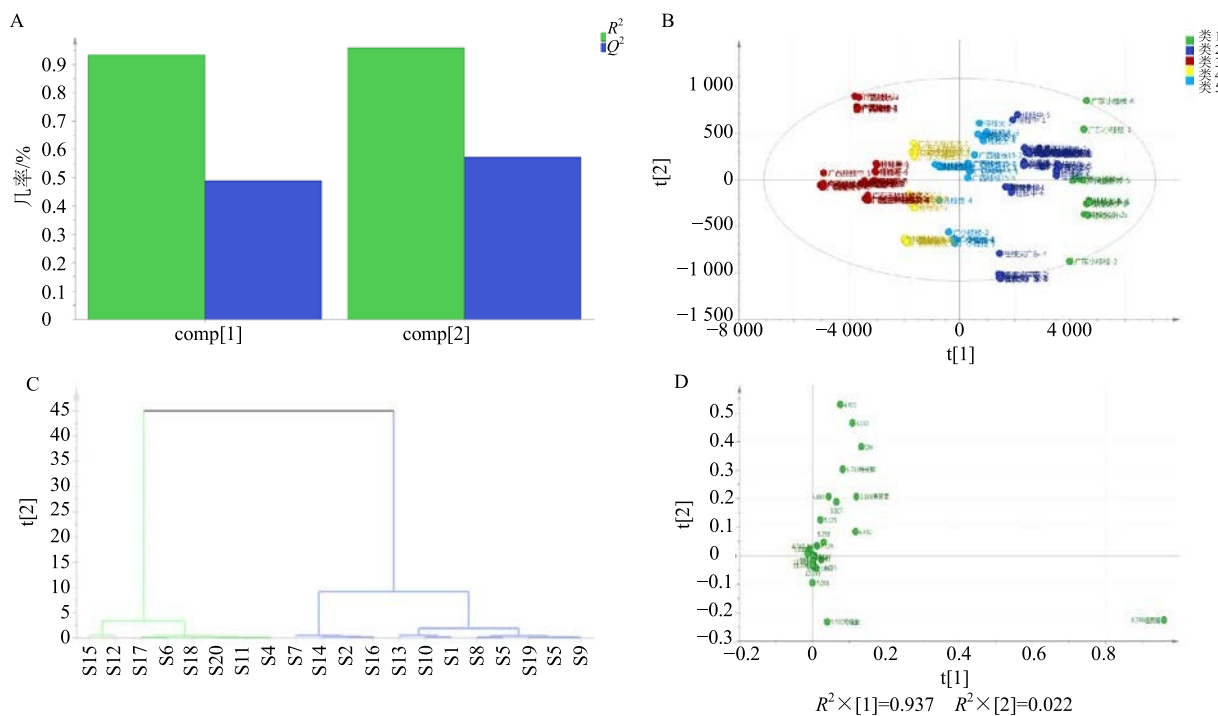
对于桂枝投料饮片等级预测问题，饮片等级为类别变量 [优 (I)、良 (II)、中 (III)、差 (IV) 4 个等级]，饮片质量指标为连续变量，对于这种连续变量到类别变量之间的函数关系，可以采用 Logistic 回归分析进行描述。由于质量各指标之间具有高度的相关性，直接建立 Logistic 模型，可能导致模型不稳定、解释上的冲突等。为此，在建立 Logistic 回归模型之前，先采用 PCA 降低指标之间的相关性，将多个指标综合为少数几个彼此独立的主成

分, 从而避免多重共线性的影响。

4.1 PCA

PCA 可对复杂信息中的多变量进行快速提取、重新组合、数学降维, 生成新的综合变量即主成分, 经投影处理后, 样本最终落在主成分组成平面上的位置, 即可表征不同样本的总体信息。将提取的数据 ($n=3$) 进行数据对齐、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。模型自动拟合 2 个主成分, 模型拟合度为 95.9%, 第 1 主成分 (PC1) 的贡献率为 95.9%, 包含差异信息最多, 说明模型拟合能力较好 (图 3-A)。以前 2 个主成分建立投影, 得到散点图 (图 3-B)。由图 3-B 可以看出 20 批桂

枝的初步分类情况, 将 20 批药材分为了 5 类, 这一结果与聚类分析 HCA 结果基本一致。对各批数据进行 HCA 分析 (图 3-C)。由图 3 可见, 样本被自动分为 5 类, 桂枝正品各等级间有明显的分类距离。S15 和 S12 被分为一类, S17、S6、S18、S20、S11 和 S4 被归为一类, S7、S14、S2 和 S16 被分为一类; S13、S10 和 S1 被归为一类; S8、S5、S19、S3 和 S9 被归为一类。结果表明, 采用 PCA 的分类分析具有较高的可靠性。由成分载荷图 (图 3-D) 可以看出, 其差异主要表现在桂皮醛 (6.298 min)、肉桂酸 (5.902 min)、桂皮醇 (5.703 min) 和香豆素 (5.398 min), 初步将这 4 个成分作为理论上的质控指标。与各抗氧化活性因子做相关性分析显示, 各化合物与 DPPH 和羟自由基清除活性相关性较高 (0.286 8、0.655 1)。



A-模型预测图 B-PCA 散点图 C-HCA 聚类图 D-成分载荷图
A-model prediction chart B-PCA score plot C-HCA cluster graph D-loading plot

图 3 不同产地桂枝投料饮片成分聚类与 PCA 结果

Fig. 3 HCA and PCA analysis results of *Cinnamomum cassia* from different origins

4.2 Logistic 建模

基于“成分-功效”理念建立二分类模型, 根据各样本对应的主成分值, 采用 Logistic 模型建立各样本对应的主成分与经验等级 (响应值) 之间的函数关系, 根据桂枝质控成分, 体外抗氧化活性比较测定结果进行初步分级。根据数据分析

将 20 批实验数据集分成训练集和测试集 2 部分, 将选定的训练集样本本质控成分和生物活性成分进行回归分析后建立回归方程, 然后对测试集样本进行分类预测。

对不同等级代表样本进行赋值, 优 (I)、良 (II)、中 (III)、差 (IV) 分别赋予响应值 4、3、2、1。

以 SPSS 软件实现 Logistic 模型参数的求解, 得到模型表达式。

$$P_{\text{优}} = \exp (32.543 - 0.974 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} + 2.197 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 0.97 \times \text{桂皮醛含量} + 10.158 \times \text{肉桂醛含量} + 44.7 \times \text{桂皮醇含量} - 43.222 \times \text{香豆素含量}) / [1 + \exp (32.543 - 0.974 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} + 2.197 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 0.97 \times \text{桂皮醛含量} + 10.158 \times \text{肉桂醛含量} + 44.7 \times \text{桂皮醇含量} - 43.222 \times \text{香豆素含量})]$$

$$P_{\text{良}} = \exp (-449.205 - 2.545 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 0.744 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 0.827 \times \text{桂皮醛含量} - 35.909 \times \text{肉桂醛含量} - 91.409 \times \text{桂皮醇含量} + 117.883 \times \text{香豆素含量}) / [1 + \exp (-449.205 - 2.545 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 0.744 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 0.827 \times \text{桂皮醛含量} - 35.909 \times \text{肉桂醛含量} - 91.409 \times \text{桂皮醇含量} + 117.883 \times \text{香豆素含量})]$$

$$P_{\text{中}} = \exp (-196.728 + 1.093 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 1.521 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} + 1.343 \times \text{桂皮醛含量} + 31.391 \times \text{肉桂醛含量} + 22.043 \times \text{桂皮醇含量} + 6.076 \times \text{香豆素含量}) / [1 + \exp (-196.728 + 1.093 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} - 1.521 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} + 1.343 \times \text{桂皮醛含量} + 31.391 \times \text{肉桂醛含量} + 22.043 \times \text{桂皮醇含量} + 6.076 \times \text{香豆素含量})]$$

$$P_{\text{差}} = \exp (199.880 - 0.875 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} + 0.892 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 0.952 \times \text{桂皮醛含量} - 33.664 \times \text{肉桂醛含量} - 20.326 \times \text{桂皮醇含量} - 9.724 \times \text{香豆素含量}) / [1 + \exp (199.880 - 0.875 \times \text{抗氧化活性}_{\text{DPPH}} + 0.892 \times \text{抗氧化活性}_{\text{OH}} - 0.952 \times \text{桂皮醛含量} - 33.664 \times \text{肉桂醛含量} - 20.326 \times \text{桂皮醇含量} - 9.724 \times \text{香豆素含量})]$$

将各指标实测值代入上式中即可计算影响因素属于各等级的概率, 从而确定投料饮片等级 (接近 100% 的则判定为该等级)。Logistic 回归模型对上述样本的拟合结果与实际结果完全一致, 说明其可以很好地表达投料饮片等级分类标准, 各等级判断见表 6。

5 讨论

5.1 提取方法的考察

本实验考察了回流法、超声提取法、索氏提取法和浸渍法, 从提取的全面性、稳定性、操作便捷性等方面考虑选择超声提取法。同时对提取溶剂进行考察, 分别选择了不同体积分数 (50%、70%、90%、100%) 甲醇、乙醇为提取溶剂, 发现以 100% 甲醇为提取溶剂时, 色谱峰基线较为平稳、提取率最高、杂质干扰较少, 因此选择 100% 甲醇为提取溶剂。

5.2 色谱条件的优化

本实验比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-甲酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液, 实验结果表明乙腈-甲酸水溶液的分离效果较好, 本实验又进一步比较了乙腈-0.05% 甲酸

表 6 20 批样品等级分类结果

Table 6 Classification results of 20 batches of samples

等级	产地/原等级	P/%
4	广东五和镇/未分级	100.00
4	广东宾亨镇/未分级	100.00
4	广西岑溪市/优	100.00
3	广西玉林/未分级	100.00
3	广东河源县/小	100.00
3	兴盛德/未分级	100.00
3	广西岑溪市/中	100.00
2	广东乐城镇/大	99.97
2	广东河源县/未分级	98.65
2	广西岑溪市/良	100.00
2	广西大官镇/未分级	96.77
2	广西玉林市/次	100.00
2	广西大全镇/未分级	100.00
1	广西通汀镇/小	100.00
1	广西通汀镇/未分级	100.00
1	广西桂平市/未分级	100.00
1	广西岑溪市/差	100.00
1	陕西步长/未分级	100.00
1	广西中沙镇/未分级	100.00
1	广西郁南县/未分级	100.00

水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.2% 甲酸水溶液的影响, 结果表明乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相时, 峰的对称性最好, 因此本实验选择乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相。综合对桂枝最大吸收波长的文献报道^[19], 采用 PDA 检测器在 210~400 nm 扫描, 并比较波长 210、254、270、280、325 nm 的色谱图, 结果表明, 254 nm 处的色谱峰信息较其他波长的信息全面, 杂质干扰小, 色谱图特征性强, 因此选择 254 nm 为检测波长。

5.3 桂枝饮片等级评价思路

中药是多成分、多靶点共同发挥疗效的复杂体系, 单一化学成分或几个成分并不能全面反映药品质量, 应采用能代表药材整体性的指纹图谱、特征图谱或其他新技术、新方法 with 定量测定相结合来评价中药产品的质量^[20]。指纹图谱结合多成分测定相对于单一成分的含量测定可以从整体上控制桂枝饮片的质量。由于相似度评价只能确认样品间相似性, 不能确定差异性, 因此在此基础上引入 Q-marker 的概念, 它是存在于中药材和中药产品中

固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质,作为反映中药安全性和有效性的标示性物质进行质量控制^[12]。本研究在指纹图谱的基础上进行了 PCA,明确不同批次桂枝聚类情况的同时,找出了在分类中贡献较大的成分,并指出其 Q-marker (香豆素、肉桂醇、肉桂酸和肉桂醛)。但是桂枝的药效作用是来自一种成分还是多种成分目前还未有定论,所以仅靠某些化学成分含量高低难以全面反映中药饮片的品质。有文献表明^[17],香豆素类化合物、桂皮醛及有机酸成分的肉桂酸,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎等多种生物学活性,并表现出显著的抗氧化能力。所以笔者认为以香豆素、肉桂醇、肉桂酸和肉桂醛的含量结合抗氧化能力来评价桂枝饮片等级会更加合理,从而建立一种二元 Logistic 回归模型,可以更好、更快速地对桂枝饮片等级进行评价和预测,也能为其他中药材的等级评价提供一些新思路。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘冲,刘荫贞,乐智勇,等. 桂枝饮片标准汤剂质量标准研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1577-1583.
- [3] 梁璐. 桂枝的药理作用分析及其临床应用研究 [J]. 中国医药指南, 2016, 14(25): 190-191.
- [4] Bolin Q, Kiran S, Richard A, et al. Anderson. Cinnamon polyphenols regulate S100 β , sirtuins, and neuroactive proteins in rat C6 glioma cells [J]. *Nutrition*, 2014, 30(2): 210-217.
- [5] Noriko T, Makiko T, Haruka F, et al. Determination of reactive oxygen generated from natural medicines and their antibacterial activity [J]. *J Pharm Anal*, 2016, 6(4): 214-218.
- [6] 尹亮亮, 刘子琛, 李慧, 等. 不同产地肉桂及桂枝中有效成分量的分析 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1094-1096.
- [7] 解思友, 张贵君. 中药的质量标准与中药安全性 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(4): 245-248.
- [8] 张海珠, 肖小河, 王伽伯, 等. 中药质量评控的第一要义: 效应当量一致性 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1571-1575.
- [9] 姜东京, 杜伟锋, 蔡宝昌, 等. 中药谱效关系在中药质量控制方面的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 43(11): 3811-3814.
- [10] 陶燕蓉, 陈曦. 中药质量评价技术的国内外研究现状及分析 [J]. 中药与临床, 2011, 2(2): 59-62.
- [11] 江振作, 王跃飞. 基于“药材基原-物质基础-质量标志物-质控方法”层级递进的中药质量标准模式研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4127-4133.
- [12] 刘昌孝. 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] 侯小涛, 郝二伟, 秦健峰, 等. 肉桂的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 20-34.
- [14] 张莉野, 田成旺, 刘素香, 等. 桂枝茯苓方的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 265-272.
- [15] 王荣, 孙艳平, 杨宽, 等. DPPH 和 T-AOC 测定法评价黄芪桂枝配伍的抗氧化能力研究 [J]. 中医药导报, 2018, 24(23): 67-73.
- [16] 张祺嘉钰, 孙毅, 冉娟, 等. 不同炮制方法对不同产地桂枝中有效成分含量及抗氧化作用的影响 [J]. 中南药学, 2019, 17(7): 1018-1023.
- [17] 孙振军. 桂皮、桂枝、桂叶油提取工艺、化学成分及其乙醇提取物的抗氧化活性研究 [D]. 南宁: 广西师范学院, 2010.
- [18] 黄再强, 王甜甜, 马逾英, 等. 基于多指标成分含量与抗氧化活性的葛根类药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1667-1676.
- [19] 刘威, 李家春, 胡军华, 等. 桂枝水提液全时段双波长融合高效液相色谱指纹图谱研究及 6 个成分定量分析 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1043-1048.
- [20] 郝敏, 陆兔林, 毛春琴, 等. 基于中药质量标志物的饮片质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1699-1708.