

• 药剂与工艺 •

基于成分-抗氧化活性相关的鸡血藤饮片等级评价研究

赵梦利¹, 刘妍如^{1*}, 宋忠兴^{1*}, 唐志书¹, 段金殿³, 陈琳¹, 刘峰², 陈彦斌², 许刚², 史鑫波¹

1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同中心, 省部共建协同秦药特色资源研究与开发重点实验室(培育), 陕西省创新药物研究中心, 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, 建立鸡血藤饮片等级评价模型。方法 采用超高效液相色谱(UPLC)技术建立鸡血藤饮片的儿茶素、表儿茶素含量测定方法, 以 ABTS^{•+}清除率、羟自由基清除率和 DPPH[•]清除率作为体外抗氧化活性评价指标, 运用 Logistic 的二分类算法, 将儿茶素、表儿茶素含量指标和抗氧化活性指标进行关联分析, 最终建立用于鸡血藤 4 个等级(优、良、中、差)评价研究的“主成分分析-二分类 Logistic 回归”模型。结果 不同产地鸡血藤饮片的儿茶素和表儿茶素质量分数分别介于 0.40~1.26 mg/g、0.57~2.02 mg/g; 抗氧化指标 ABTS^{•+}、羟自由基和 DPPH[•]清除率分别介于 12.96%~51.76%、30.65%~66.65%、37.65%~60.33%。二分类 Logistic 回归分析结果显示, 17 个批次的鸡血藤及其 2 个伪品(大血藤和牛马藤)饮片分布在优级、中级、差级各有 5 个批次, 良级有 4 个批次, 拟合概率 *P* 值均大于 94%。结论 基于 Logistic 回归分析建立的鸡血藤等级评价模型, 可用于不同产地来源鸡血藤的等级划分。

关键词: 鸡血藤; 等级评价; 抗氧化活性; 超高效液相色谱; 二分类 Logistic 回归分析

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)04-0943-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.019

Research on grade prediction of *Spatholobi Caulis* via components-anti-oxidant activity correlations

ZHAO Meng-li¹, LIU Yan-ru¹, SONG Zhong-xing¹, TANG Zhi-shu¹, DUAN Jin-ao³, CHEN Lin¹, LIU Feng², CHEN Yan-bin², XU Gang², SHI Xin-bo¹

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources Cultivation, Shaanxi Province Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China
2. Shaanxi International Business College, Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xianyang 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 The model for grade evaluation of *Spatholobi Caulis* medicinal slices was constructed based on the quality control idea of traditional Chinese medicines that “components reflect activity and activity points to efficacy”. **Methods** A method to determinate catechin and epicatechin content by using ultra performance liquid chromatography (UPLC) was proposed. ABTS^{•+} clearance rate, hydroxyl radical clearance rate and DPPH[•] clearance rate were used as evaluation indexes of biological activity.

收稿日期: 2019-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(81501229); 国家自然科学基金项目(81773919); 陕西省“特支计划”青年拔尖人才项目; 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-QIN-45)

作者简介: 赵梦利(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂。Tel: 18329750518 E-mail: zml18329750518@163.com

*通信作者 宋忠兴(1974—), 男, 副主任药师, 研究方向为中药新药与产业化开发。Tel: 13992092403 E-mail: szx74816@sina.com

刘妍如(1985—), 女, 副教授, 研究生导师, 研究方向为药物分析。Tel: (029)38182207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

Correlations between content and anti-oxidant activity were analyzed by the logistic algorithm. Finally, a “principal component analysis-logistic regression” model for grade prediction of *Spatholobi Caulis* was constructed. **Results** Catechin and epicatechin content in *Spatholobi Caulis* medicinal slices from different origins was between 0.40—1.26 mg/g and 0.57—2.02 mg/g, respectively. The anti-oxidant indexes ABTS^{•+}, hydroxyl radical and DPPH[•] clearance rate were between 12.96%—51.76%, 30.65%—66.65%, and 37.65%—60.33%, respectively. The binary logistic regression analysis results showed that five batches were evaluated as excellent, average and poor rank, and four batches were considered as good rank ($P > 94\%$) among 17 batches of *Spatholobi Caulis* herbal pieces and its two kinds of counterfeit (*Sargentodoxa cuneata* and *Mucuna sempervirens*). **Conclusion** Binary logistic regression model for grade evaluation of *Spatholobi Caulis* medicinal slices was constructed preliminarily. It is applicable to assess quality of *Spatholobi Caulis* herbal pieces. The grading evaluation model of *Spatholobi Caulis* via logistic regression analysis can be used to classification of *Spatholobi Caulis* from different sources.

Key words: *Spatholobi Caulis*; grade prediction; anti-oxidant activity; ultra performance liquid chromatography; binary logistic regression

鸡血藤 *Spatholobi Caulis* 为豆科密花豆属植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn. 的干燥藤茎, 具有活血补血、调经止痛、舒筋活络之功效, 主产于广东、广西、云南等地区^[1], 但由于野生品与栽培品不加区别、生长周期不同、采收时间不同、运输贮藏差异等因素导致药材质量参差不齐^[2-4]。现代药理学表明, 鸡血藤具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、调节血脂等药理活性^[5-7]。氧化应激在病毒感染、肿瘤形成、动脉粥样硬化、糖尿病等多种疾病的发病机制中起着重要作用, 抗氧化剂可以减缓氧化应激带来的危害。已经有多项研究表明鸡血藤提取物具有明确的抗氧化作用, 有望成为一种替代或辅助治疗氧化应激性疾病的药物^[8-9]。鸡血藤的抗氧化能力主要来自其黄酮类成分儿茶素和表儿茶素, 二者单体富集产生的原青花素显示出较强的抗氧化活性^[10]。但有数据显示不同来源的鸡血藤饮片中心儿茶素与表儿茶素含量差异较大^[11-12]。

《中国药典》2015年版规定鸡血藤的检查项目包括性状鉴定、显微鉴别、薄层色谱鉴别、水分检查、灰分检查以及醇溶性浸出物检查等^[1]; 目前对于鸡血藤的质量评价仅集中于测其一种或几种有效成分含量^[13-14], 此法判断其质量优劣有失偏颇, 难以预测中药复杂的化学实体与生命分子网络的交互作用。

由于中药成分组成的复杂性, 以个别化学指标成分控制中药质量的模式还存在与临床有效性、安全性关联不紧密等问题, 而生物活性测定是反映临床功效的基本方法之一。近年来, 有学者提出在化学含量测定的基础上, 开展中药复方的生物活性测定, 可以综合评价并控制其质量^[15-17]。因此本研究对不同批次的鸡血藤及其伪品的儿茶素和表儿茶素含量、体外抗氧化能力进行测定, 再通过二分类

Logistic 回归分析^[18-19]预测出鸡血藤饮片归属等级, 以为临床选择品质优良的原料药提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

FW-1000AD 高速万能粉碎机, 天津鑫博得仪器有限公司; ACQUITY H-CLASS 型超高效液相色谱系统, 美国沃特世公司; 包括二元超高压溶剂系统、FTN 自动进样管理器、PDA 检测器和 Empower3 色谱工作站; 1510 型全波长酶标仪, 美国赛默飞公司; Sartorius CPA225D 十万分之一分析天平, 德国赛多利斯科学仪器有限公司; DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅, 上海科恒实业发展有限公司; Micro 17R 美国赛默飞微量低温冷冻离心机, 上海珂淮仪器有限公司。

1.2 试剂

鸡血藤对照药材(批号 S324-N1P9)购于中国食品药品检定研究院; 对照品 (+)-儿茶素(批号 MUST-17060115)、表儿茶素(批号 MUST-18050411), 购于成都曼思特生物科技有限公司, HPLC 测定质量分数分别为 99.96%、99.98%; 甲醇, 分析纯, 成都市科隆化学品有限公司; 甲酸, 美国 Sigma-Aldrich 化工有限公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 德国默克公司; 屈臣氏水, 屈臣氏集团(香港)有限公司; 总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 快速法), 上海碧云天生物技术有限公司; 羟自由基(OH[•])试剂盒(批号 W27F10E81251), 南京建成生物工程研究所; DPPH 试剂, 批号 W27F10E81251, 上海源叶生物科技有限公司。

1.3 药材

本实验所使用的鸡血藤饮片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豆科密花豆属植物密花豆 *Spatholobus*

suberectus Dunn. 的干燥藤茎经加工后制成的饮片。19 批鸡血藤饮片及伪品大血藤 *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils. 和牛马藤 *Mucuna sempervirens* Hemsl. 信息见表 1。

表 1 鸡血藤及其伪品基本信息

Table 1 Basic information of *Spatholobi Caulis* and its counterfeits

编号	品种	来源或采集地点	饮片分级
S1	鸡血藤	陕西步长制药有限公司	未分级
S2	鸡血藤	陕西兴盛德药业有限责任公司	未分级
S3	鸡血藤	广西桂平大洋岭(特红)	未分级
S4	鸡血藤	广西桂平大洋岭(二级红)	未分级
S5	鸡血藤	广西平乐县(优)	优
S6	鸡血藤	广东普宁市(优)	优
S7	鸡血藤	广西平乐县(良)	良
S8	鸡血藤	广西平乐县(中上)	中级
S9	鸡血藤	广西(统)	统货
S10	鸡血藤	广西(优)	优
S11	鸡血藤	安徽大别山	未分级
S12	鸡血藤	广西贺州	未分级
S13	鸡血藤	广西柳州	未分级
S14	鸡血藤	云南昆明(次)	次
S15	鸡血藤	广东韶关	未分级
S16	鸡血藤	浙江磐安县	未分级
S17	鸡血藤	越南进口	未分级
S18	大血藤	广西柳州	差
S19	牛马藤	云南昆明	差

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 鸡血藤粉末的制备 称取不同批次的鸡血藤饮片, 经 FW-1000AD 高速万能粉碎机粉碎成过 4 号筛(65 目)的粉末, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 40 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 140 W, 频率 42 kHz) 45 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 抽滤, 用 10 mL 70% 乙醇洗涤残渣 2 次, 90 °C 水浴蒸干, 10 mL 70% 乙醇定容, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 取儿茶素和表儿茶素对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶剂制成含儿茶素 0.29 mg/mL 和表儿茶素 0.35 mg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.1.4 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-乙腈; 梯度洗脱: 0~3 min, 5% 乙腈; 3~20 min, 5%~15% 乙腈; 20~21 min, 15% 乙腈; 21~23 min, 15%~5% 乙腈; 后运行 2 min; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温为 35 °C; 检测波长 280 nm; 进样量为 5 μL。理论塔板数以儿茶素、表儿茶素计算均大于 4 000。

2.1.5 系统适应性 将不同产地供试品溶液和混合对照品溶液分别进样 5 μL, 记录 280 nm 色谱图(图 1)。通过比较在线紫外光谱图和保留时间, 儿茶素和表儿茶素强度适中且与相邻峰分离较好(分离度>1.5), 因此选作参照物峰。

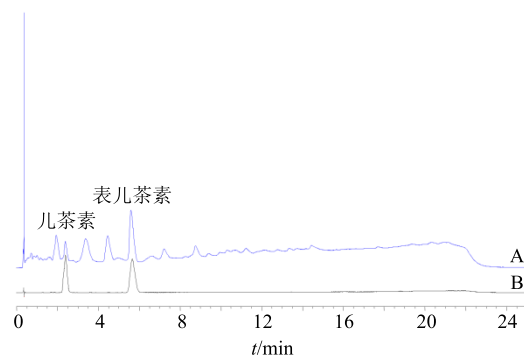


图 1 鸡血藤样品 (S1, A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 UPLC chromatograms of *Spatholobi Caulis* sample (S1, A) and mixed standards solution (B)

2.1.6 线性关系考察 分别吸取一定量的“2.1.3”项下制备的混合对照品溶液, 加甲醇稀释成儿茶素质量浓度分别为 29、58、87、116、145、174 μg/mL, 表儿茶素质量浓度分别为 35、70、105、140、175、210 μg/mL 的系列溶液, 按照“2.1.4”项下色谱条件进样。以峰面积积分值(A)对系列对照品溶液质量浓度(C)进行线性回归, 得回归方程分别为儿茶素 $A=4\,704.6\,C-2\,059$, $r=0.999\,8$; 表儿茶素 $A=5\,151.2\,C-8\,527.3$, $r=0.999\,4$; 结果表明儿茶素在 29~174 μg/mL, 表儿茶素在 35~210 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 取同一供试样品(S1)约 2 g, 按“2.1.4”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 结果显示儿茶素、表儿茶素保留时间的 RSD 为 0.94%、1.02%, 峰面积的 RSD 分别为 2.72%、0.91%, 表明该方法精密度良好。

2.1.8 重复性试验 取同一批次鸡血藤样品(S1)约 2 g, 按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,

按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,结果显示儿茶素、表儿茶素保留时间的 RSD 分别为 1.15%、1.13%,峰面积的 RSD 分别为 1.86%、2.66%,表明方法重复性良好。

2.1.9 稳定性试验 取同一供试品溶液(S1)约 2 g,分别于 0、6、12、18、24 h,按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,结果显示儿茶素、表儿茶素保留时间的 RSD 分别为 0.42%、0.89%,峰面积的 RSD 分别为 1.33%、2.165%,表明该方法稳定性良好。

2.1.10 加样回收率试验 取鸡血藤药材样品(S1)约 1 g,平行 6 份,精密称定,加入相应的儿茶素、表儿茶素对照品,按供试品溶液的配制方法处理并测定,计算回收率,结果儿茶素、表儿茶素的平均加样回收率分别为 99.09%、100.40%,RSD 分别为 1.80%、1.57%,结果表明本方法准确性良好。

2.1.11 儿茶素和表儿茶素的含量测定 不同批次鸡血藤及其伪品中儿茶素、表儿茶素的含量测定结果见表 2。结果显示陕西步长制药有限公司提供的鸡血藤饮片中(S1)儿茶素的含量较高,广东韶关产地鸡血藤中(S15)的儿茶素含量较低,伪品大血藤(S18)中的儿茶素含量属 19 个批次中最低;安徽大别山鸡血藤(S11)中表儿茶素的含量较高,广西贺州(S12)鸡血藤中的表儿茶素较低,伪品大血藤(S18)和牛马藤(S19)中的表儿茶素处于较低水平。

2.2 抗氧化活性测定

2.2.1 鸡血藤提取液制备 取不同批次的鸡血藤及表 2 样品中儿茶素、表儿茶素含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Simultaneous determination for catechin and epicatechin from *Spatholobi Caulis* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)	
	儿茶素	表儿茶素		儿茶素	表儿茶素
S1	1.26±0.04	1.27±0.02	S11	0.81±0.01	2.02±0.03
S2	0.98±0.07	1.28±0.03	S12	0.69±0.01	0.56±0.04
S3	0.69±0.06	1.15±0.04	S13	1.19±0.01	1.20±0.01
S4	0.66±0.14	0.57±0.02	S14	1.26±0.05	1.77±0.02
S5	1.03±0.04	1.37±0.06	S15	0.40±0.02	0.59±0.02
S6	0.66±0.01	0.96±0.02	S16	0.92±0.09	1.63±0.17
S7	1.11±0.18	0.95±0.13	S17	0.70±0.03	1.15±0.11
S8	1.06±0.05	1.23±0.06	S18	0.00±0.00	0.87±0.02
S9	0.87±0.06	1.20±0.08	S19	0.71±0.01	0.77±0.02
S10	0.87±0.03	1.00±0.08			

其伪品粉末(过四号筛)约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 140 W,频率 42 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得鸡血藤提取液。

2.2.2 ABTS·⁺自由基清除率的测定 将各批次鸡血藤及其伪品按“2.2.1”项下方法制备提取液。按照总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 快速法)说明书操作,计算不同批次鸡血藤 ABTS·⁺清除率。结果见表 3,可得广西桂平大洋岭(二级红)(S4)的鸡血藤 ABTS·⁺自由基清除率较高,安徽大别山(S11)的鸡血藤 ABTS·⁺自由基清除率较低。

2.2.3 OH·清除率的测定 将各批次鸡血藤按“2.2.1”项下方法制备提取液。方法参考南京建成生物工程研究所提供的 OH·试剂盒说明书,计算出样品的 OH·清除率。结果见表 3,可得广东普宁市优级鸡血藤(S6)清除 OH·能力较强,大血藤(S18)清除 OH·能力较弱。

表 3 19 批样品对 ABTS·⁺、羟自由基和 DPPH·的清除率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 ABTS·⁺, hydroxyl radical and DPPH· clearance rate of 19 batches of samples ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	清除率/%		
	ABTS· ⁺	OH·	DPPH·
S1	31.75±1.40	66.65±1.27	46.54±0.57
S2	40.79±0.82	45.49±1.99	41.41±0.79
S3	38.29±1.16	58.78±0.80	46.04±1.84
S4	51.76±0.64	54.29±0.79	58.33±1.53
S5	47.50±1.37	47.50±1.37	52.00±1.00
S6	33.08±1.29	67.69±0.78	45.59±1.04
S7	46.78±0.96	51.72±0.73	46.69±0.78
S8	29.65±0.61	62.89±0.89	43.58±0.60
S9	43.21±0.97	63.07±0.27	46.17±1.20
S10	41.30±0.73	49.70±1.37	60.33±1.73
S11	12.96±0.89	30.65±0.83	55.18±1.38
S12	42.98±1.27	56.63±0.68	47.00±1.41
S13	36.34±1.31	43.77±1.00	42.45±1.29
S14	31.01±0.68	47.69±1.53	44.07±1.62
S15	46.33±0.56	46.80±1.44	54.12±1.91
S16	31.48±1.05	40.74±0.86	38.99±0.70
S17	32.70±1.26	53.79±0.55	37.65±0.76
S18	21.47±0.89	20.76±0.48	51.11±0.38
S19	13.02±0.41	24.40±1.11	40.53±0.77

2.2.4 DPPH·自由基清除率的测定 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 溶液备用, 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 处的吸光度值。计算不同批次样品 DPPH·自由基清除率, 结果见表 3, 可得从广西购进的优级鸡血藤 (S10) DPPH·自由基清除率较高, 越南进口 (S17) 鸡血藤 DPPH·自由基清除率较低, 伪品大血藤 (S18) DPPH·自由基清除率却相对较高。

2.3 鸡血藤饮片等级分类

影响鸡血藤饮片质量的因素主要分为 2 类: 第 1 类是生物活性, 如体外抗氧化活性; 第 2 类是主要成分的质控含量。由于模式识别模型的建立和参数的确定是由数据驱动, 因此需要利用药材分类标准来生成数据作为建模基础。

2.3.1 主成分分析 (PCA) 为了更直观地评价模型对样品的分类能力, 对各样品数据进行降维处理, 采用 PCA 方法观察样品差异情况。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 (指纹图谱导出的各成分峰面积、抗氧化活性指标) 作为观测值 (X) 进行 PCA。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 94.4% (图 2-A)。第 1 主成分 PC1 的贡献率为 98.0%, 包含差异信息最多, 说明模型拟合能力较好。以前 2 个主成分建立投影, 得到散点图 (图 2-B), 进行初步的鸡血藤饮片分类。并对各批数据进行聚类分析 (HCA), 由图 2-C 可见, 鸡血藤正品各等级间有明显的分类距离。陕西步长制药有限公司 (S1)、陕西兴盛德药业有限责任公司 (S2)、广西平乐县 (良, S7)、广西平乐县 (中上, S8)、广西 (统, S9)、广西柳州 (S13)、云南昆明 (次, S14) 鸡血藤被分为一类 (黄色); 广西桂平大洋岭 (特红, S3)、广西平乐县 (优, S5)、广东普宁市 (优, S6)、浙江磐安县 (S16)、越南进口 (S17) 鸡血藤被归为一类 (蓝色); 广西桂平大洋岭 (二级红, S4)、广西 (优, S10)、广西贺州 (S12)、广东韶关 (S15) 鸡血藤被分为一类 (绿色); 安徽大别山 (S11) 鸡血藤被归为一类 (红色)。结果表明, 采用 PCA 的分类分析具有较高的可靠性。

2.3.2 Logistic 建模^[18-19] 根据“2.3.1”项的预测结果, 对不同等级代表样本进行赋值, 优 (I)、良

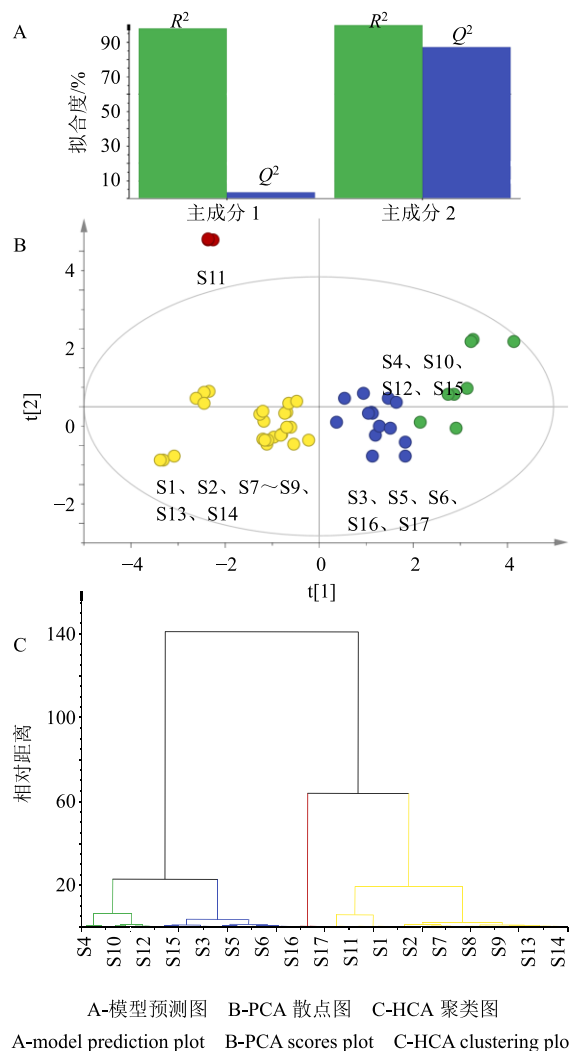


图 2 不同产地鸡血藤饮片聚类结果

Fig. 2 Clustering results of *Spatholobi Caulis* medicinal slices from different origins

(II)、中 (III)、差 (IV) 分别赋予响应值 4、3、2、1。以 SPSS 20.0 软件实现 Logistic 模型参数的求解, 得到模型表达式分别为 $P_{\text{优}} = \exp(187.963 + 0.270 X_{\text{ABTS}} + 1.797 X_{\text{OH}} - 5.934 X_{\text{DPPH}} + 145.579 C_{\text{儿茶素}} - 159.447 C_{\text{表儿茶素}}) / [1 + \exp(187.963 + 0.270 X_{\text{ABTS}} + 1.797 X_{\text{OH}} - 5.934 X_{\text{DPPH}} + 145.579 C_{\text{儿茶素}} - 159.447 C_{\text{表儿茶素}})]$, $P_{\text{良}} = \exp(-106.767 + 1.961 X_{\text{ABTS}} + 4.503 X_{\text{OH}} - 3.734 X_{\text{DPPH}} - 173.123 C_{\text{儿茶素}} + 87.723 C_{\text{表儿茶素}}) / [1 + \exp(-106.767 + 1.961 X_{\text{ABTS}} + 4.503 X_{\text{OH}} - 3.734 X_{\text{DPPH}} - 173.123 C_{\text{儿茶素}} + 87.723 C_{\text{表儿茶素}})]$, $P_{\text{中}} = \exp(-450.921 + 12.810 X_{\text{ABTS}} - 3.969 X_{\text{OH}} + 0.408 X_{\text{DPPH}} - 197.176 C_{\text{儿茶素}} + 248.085 C_{\text{表儿茶素}}) / [1 + \exp(-450.921 + 12.810 X_{\text{ABTS}} - 3.969 X_{\text{OH}} + 0.408 X_{\text{DPPH}} - 197.176 C_{\text{儿茶素}} + 248.085 C_{\text{表儿茶素}})]$, $P_{\text{差}} = \exp(-204.710 - 2.192 X_{\text{ABTS}} - 2.575 X_{\text{OH}} + 6.070$

$X_{DPPH} + 88.536 C_{儿茶素} + 19.628 C_{表儿茶素} / [1 + \exp(-204.710 - 2.192 X_{ABTS} - 2.575 X_{OH} + 6.070 X_{DPPH} + 88.536 C_{儿茶素} + 19.628 C_{表儿茶素})]$ 。将各指标实测值代入各式中即可计算影响因素属于各等级的概率,从而确定鸡血藤饮片等级。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,各等级判断如表 4 所示。

表 4 不同来源鸡血藤饮片及其伪品的等级分类结果

Table 4 Ranking results of *Spatholobi Caulis* medicinal slices from different sources and its counterfeits

等级	编号	来源或采集地点	概率
4	S12	广西贺州	0.99
4	S1	陕西步长制药有限公司	0.99
4	S13	广西柳州	0.94
4	S7	广西平乐县(良)	0.99
4	S8	广西平乐县(中上)	0.99
3	S3	广西桂平大洋岭(特红)	1.00
3	S6	广东普宁市(优)	1.00
3	S17	越南进口	1.00
3	S9	广西(统)	1.00
2	S4	广西桂平大洋岭(二级红)	0.99
2	S15	广东韶关	1.00
2	S5	广西平乐县(优)	1.00
2	S2	陕西兴盛德药业有限责任公司	0.99
2	S16	浙江磐安县	0.99
1	S14	云南昆明(次)	0.99
1	S10	广西(优)	0.99
1	S11	安徽大别山	1.00
1	S18	广西柳州	0.99
1	S19	云南昆明	1.00

3 讨论

3.1 供试品制备工艺优化

鸡血藤的主要化学成分为儿茶素和表儿茶素,二者均易溶于水和醇,根据其溶解性,分别以水、乙醇、甲醇为溶剂进行提取实验^[11-12,20-21],测定儿茶素和表儿茶素含量,结果 70%乙醇溶剂中主要化学成分的含量最高。又分别比较了冷浸、加热回流、超声振荡提取 3 种提取方法,在提取充分的条件下,加热回流、超声振荡提取 2 种方法得到的指纹图谱全貌及各峰强度均无明显差别,综合比较,超声振荡提取方法简便,不易破坏有效成分,是黄酮类成分分析常用方法,适合大量样品的快速提取,最终

采用超声振荡提取法。为了获得最佳的参数设置,选择超声时间(30~80 min)、超声温度(30~60 ℃)、超声体积(20~60 mL)作为优化参数,以儿茶素和表儿茶素提取率作为评价指标。优化结果显示,超声时间为 30 min,超声温度为 30 ℃时,超声体积为 40 mL 提取率较高。

3.2 色谱条件优化

采用 UPLC 技术测定不同批次鸡血藤含量时,曾选用甲醇-0.02%磷酸水溶液^[21]、乙腈-0.1%甲酸水溶液^[22]、甲醇-冰醋酸-水^[12,20-21]为流动相,发现乙腈-0.1%甲酸水溶液流动相为最佳,鸡血藤中儿茶素、表儿茶素得到较好分离,且峰形良好。指纹图谱分析考察发现 280 nm 波长下样品中色谱峰信息丰富,背景噪音低。

按照本实验设置的洗脱程序,儿茶素和表儿茶素保留时间分别为 2.38 和 5.64 min。为保证各批次样品充分洗脱,因此,将洗脱时间设置为 25 min。

3.3 指标测定及方法选择

现代药理学研究表明,鸡血藤提取物有很强的抗氧化活性^[10,23-24],其产生主要作用的是儿茶素和表儿茶素单体富集产生的原青花素。因此,可以将抗氧化能力作为本次饮片等级评价的指标之一。目前评价鸡血藤抗氧化能力的方法主要分为体内、体外 2 种^[25-26],相较于体内实验^[27-29],体外评价抗氧化能力主要通过测定鸡血藤提取液的 ABTS·⁺自由基清除率、羟自由基清除率和 DPPH·自由基清除率来反映^[24,30-31],该法具有简便、迅速、影响因素少的特点,对于该实验鸡血藤批次较多,体外研究法是比较为简便的方法。

3.4 儿茶素与表儿茶素含量与抗氧化能力的关系

本研究显示儿茶素和表儿茶素含量与其体外抗氧化能力并不成正比,这说明鸡血藤饮片体外抗氧化能力是其多种成分共同作用的结果,进一步说明建立二分类 Logistic 算法评价鸡血藤饮片等级的合理性,也为鸡血藤饮片的质量控制提供一定的依据。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 胡 旻.鸡血藤与常用混淆品的真伪鉴别[J].浙江中西医结合杂志,2013,23(5):419-427.
- [3] 刘 静,王晓静,戴 忠,等.鸡血藤研究进展[J].中国药事,2019,33(2):188-194.
- [4] 曹 斌,韦桂宁.鸡血藤中黄酮类化合物药理作用研究进展[J].内科,2017,12(3):341-343.

- [5] 符影, 程悦, 陈建萍, 等. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1229-1234.
- [6] 秦建鲜, 黄锁义. 鸡血藤药理作用的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 180-183.
- [7] 杨冉冉, 刘新, 姬蕾, 等. 鸡血藤质量控制及药理作用研究进展 [J]. 环球中医药, 2018, 11(11): 1833-1838.
- [8] Fu Y F, Jiang L H, Zhao W D, *et al.* Immunomodulatory and antioxidant effects of total flavonoids of *Spatholobus suberectus* Dunn on PCV2 infected mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8676-8684.
- [9] Chen H L, Yang J, Fu Y F, *et al.* Effect of total flavonoids of *Spatholobus suberectus* Dunn on PCV2 induced oxidative stress in RAW264.7 cells [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2017, 17(1): 244-252.
- [10] Li W T, Liu J, Guan R G, *et al.* Chemical characterization of procyanidins from *Spatholobus suberectus* and their antioxidative and anticancer activities [J]. *J Funct Foods*, 2015, 12: 468-477.
- [11] 李坚, 周泽函, 严秋筠. HPLC 法测定不同产地鸡血藤中表儿茶素的含量 [J]. 鄱阳医学院学报, 2008, 27(2): 176-178.
- [12] 郑岩, 王邠, 王京丽, 等. 高效液相测定不同产地鸡血藤药材中黄酮类化合物的含量 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1920-1922.
- [13] 刘静, 郭日新, 王晓静, 等. 鸡血藤饮片质量控制研究 [J]. 中国药事, 2019, 33(5): 534-543.
- [14] 杨冉冉. 中药鸡血藤的质量控制及对斑马鱼抗血栓作用的初步研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [15] 李寒冰, 吴宿慧, 唐进法, 等. 中药质量生物标志物研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4556-4561.
- [16] 游云, 廖福龙, 黄璐琦. 基于生物活性测定开展中药质量控制的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 452-456.
- [17] 闫亚峰, 宋忠兴, 刘妍如, 等. 基于“生物活性-质量标志物”关联的红花等级评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4683-4690.
- [18] 李柳柳, 刘妍如, 颜永刚, 等. 基于二分类 Logistic 回归分析的桃仁等级预测研究 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4691-4696.
- [19] 江大海, 刘妍如, 王梅, 等. 基于二分类 Logistic 回归分析的桂枝等级预测研究 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4697-4704.
- [20] 杜憬生, 吴立群, 马鸿雁. 一测多评法测定鸡血藤中 4 种黄酮成分含量 [J]. 中药材, 2017, 40(4): 881-883.
- [21] 陆雪丽, 潘晓鹃, 邓萌萌, 等. 鸡血藤提取物的 TLC 鉴别及儿茶素和表儿茶素的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 88-92.
- [22] 肖小河, 鄢丹, 王伽伯, 等. 关于中药质量生物检定的几点商榷 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(4): 504-508.
- [23] 张爱文, 何彩美, 钟晶, 等. 鸡血藤提取物的制备及药理毒理研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2011, 30(3): 20-22.
- [24] 谢学明, 钟远声, 李熙灿, 等. 22 种华南地产药材的抗氧化活性研究 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22(1): 48-50.
- [25] 董攀, 罗泽欣, 王冬梅. 鸡血藤原花青素的提取工艺和体外抗氧化活性 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2017, 56(1): 8-13.
- [26] 王婷婷. 丰城鸡血藤黄酮类化合物富集分离及抗氧化性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [27] 刘仰斌, 张志花. 鸡血藤总黄酮对大鼠佐剂性关节炎作用的实验研究 [J]. 医学研究与教育, 2014, 31(5): 1-4.
- [28] 谭潇. 基于抗氧化和促造血双重调控作用研究鸡血藤及其活性单体儿茶素的抗辐射机制 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2016.
- [29] 刘晋菰, 周奇坤, 王洋, 等. 鸡血藤醇提物对黄颡鱼抗氧化能力、非特异性免疫力和抗病力的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30(8): 3208-3218.
- [30] 张夏辉. 鸡血藤中黄酮类化合物提取及抗氧化性的研究 [D]. 南宁: 广西科技大学, 2013.
- [31] 黄锁义, 罗建华, 张丽丹, 等. 鸡血藤总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2337-2338.