

基于“药效论质”评价柴胡质量及其等级预测插件开发

常百金^{1,2}, 唐志书^{1,2,3*}, 邱智东^{1*}, 刘妍如², 宋忠兴², 贾艾玲¹

1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

2. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西 咸阳 712083

3. 中国中医科学院, 北京 100700

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, 建立用于柴胡 *Bupleurum chinense* 等级评价的二分类 Logistic 模型, 并开发出一种柴胡等级评价计算器。方法 采用二分类 Logistic 算法将柴胡的柴胡皂苷 a、d 含量、环氧酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 生物效价、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, 建立用于柴胡的等级预测模型, 并进行验证。采用多元回归分析方法、二分类 Logistic 回归模型结合柴胡成分-药效相关数据, 建立等级评价方程。采用 JavaScript 和 CSS3 技术, 将等级评价方程嵌入 HTML 进行计算器插件的开发。结果 Logistic 预测模型概率公式初步将 15 个产地来源柴胡最终分为优、良、中、差 4 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 90%。开发了一种无需将数据传给服务器端, 通过动态地输入测定的数据, 可直接输出柴胡等级评价结果的计算器。结论 首次将柴胡功效-成分相结合, 建立评价柴胡质量等级的方法, 可为柴胡质量评价提供重要依据; 并开发出一种基于“药效-成分”相关联的柴胡质量等级快速评价的计算器插件。

关键词: 柴胡; 药效论质; 等级评价; 中药; 质量控制; 主成分分析; Logistic 算法; 计算器; 柴胡皂苷; 环氧酶 2; 生物效价; ABTS⁺; DPPH·; 羟自由基; 多元回归分析

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)02-0424-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.012

Development of plug-in for quality evaluation and grade prediction of *Bupleurum chinense* based on “drug efficacy evaluating quality”

CHANG Bai-jin^{1,2}, TANG Zhi-shu^{1,2,3}, QIU Zhi-dong¹, LIU Yan-ru², SONG Zhong-xing², JIA Ai-ling¹

1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization, State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712083, China

3. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective Based on the quality control research idea of “ingredients reflect activity, activity points to efficacy”, to establish a binary Logistic model for the grade evaluation of Chaihu (*Bupleuri Radix*, BR, 柴胡) and develop a grade evaluation calculator for medicinal materials. **Methods** The binary Logistic algorithm was used to correlate the contents of saikosaponins a and d, cyclooxygenase-2 (COX-2) biological potency, ABTS⁺ scavenging rate, DPPH· scavenging rate, and hydroxyl radical scavenging ability in BR, establish a grade prediction model for BR, and verify it. Using multiple regression analysis method and binary Logistic regression model combined with the data related to the composition-pharmacological effect of BR to establish the grade evaluation equation. The JavaScript and CSS3 techniques were used to embed the rank evaluation equation into HTML for the

收稿日期: 2021-08-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173970); 陕西省科技厅重点产业创新链 (群) 项目 (2020ZDLSF05-08); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-21); 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302)

作者简介: 常百金, 男, 博士研究生, 主要从事中药制剂新技术研究。Tel: (029)38185060 E-mail: 894199850@qq.com

*通信作者: 唐志书, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药制剂新技术与中药质量分析研究。Tel: (029)38185060 E-mail: tzs6565@163.com

邱智东, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药制剂研究。Tel: (0431)86172204 E-mail: qzdczy@163.com

development of the calculator plug-in. **Results** The probability formula of Logistic prediction model divided BR from 15 producing areas into four grades: excellent, good, medium and poor. The predicted attribution grade corresponding to each batch was clear, and the fitting probability P value was all greater than 90%. A calculator has been developed that can directly output herb grade evaluation results by dynamically inputting the measured data without having to transfer the data to a server. **Conclusion** It is the first time to combine the efficacy-composition of BR to establish a method for evaluating the grade of BR, which can be used as an important basis for future quality evaluation of BR, and develop a calculator plug-in for rapid evaluation of quality grade of Chinese medicinal materials based on the correlation of “pharmacodynamics and components”.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; drug efficacy evaluating quality; grade evaluation; traditional Chinese medicine; quality control; principal component analysis; Logistic algorithm; calculator; saikosaponin; cyclooxygenase-2; bioactivity; agreement of basic telecommunications services; diphenyl picryl hydrazyl; hydroxyl radical; multiple regression analysis

柴胡 *Bupleuri Radix* (BR) 为伞形科柴胡属植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonerifolium* Willd. 的干燥根^[1], 按性状不同, 分别习称“北柴胡”和“南柴胡”。柴胡具有解热、保肝、抗炎、抗肿瘤、免疫调节、抗抑郁等多种药理活性^[2]。药用植物资源丰富、分布广, 临床应用常以北柴胡为主, 且长期以来在民间传统医学中用作消炎药、解热药和镇痛药^[3]。主要分布于我国东北、华北、西北、华东和华中各地。目前, 柴胡质量控制主要参考《中国药典》2020 年版, 以单一成分柴胡皂苷 a、d 含量作为主要质控指标。其混淆品小叶黑柴胡的柴胡皂苷 a、d 含量也符合《中国药典》2020 年版^[4]。因此, 单一成分并不能全面地反映药材内在质量, 且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^[5]。故需要根据成分与药效间多维度、多层次的相互作用对柴胡质量进行全方位评价。

目前, 柴胡只有选货和统货的区别, 随着野生资源的减少, 药材市场上以栽培品为主, 造成品种混乱, 质量参差不齐, 无明确区分柴胡质量等级的方法, 若以柴胡皂苷 a、d 含量高低对市场上的柴胡进行分类可能具有一定的片面性, 故将柴胡主要活性成分及药效作为评价指标, 其中柴胡皂苷 a、d 质量分数较高, 具有良好的抗炎活性^[6-8]。已有研究表明^[9]环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 是柴胡抗炎作用机制之一, 它是花生四烯酸代谢和多种炎症介质 (前列腺素和血栓素 A_2) 生物合成过程中重要的限速酶之一, 具有 2 种亚型即 COX-1 和 COX-2。COX-1 是机体固有的酶, 在正常情况下存在于胃肠道、肾脏和血小板等组织细胞, 不能被诱导增加, 通过促进前列腺素及血栓素 A_2 的合成, 发挥保护胃黏膜、维持肾血流量、调节血小板聚集、外周血管张力等内环境稳定的作用。而大多数细胞中不出现

COX-2, 可在生长因子、细胞因子、细胞毒素、致炎物质等刺激下表达, 产生的底物前列腺素可引起炎症、疼痛、发热反应, 这与柴胡传统应用于抗炎解热的作用相符合^[10]。因此, 通过测定对 COX-2 的抑制作用, 可用于评价柴胡抗炎活性。

除此之外, 柴胡在抗氧化方面具有较强的药理作用^[11-12]。研究表明, 氧化应激和炎症被认为是各种疾病病理的核心机制, 持续活跃的炎症反应可导致活性氧的过度产生, 诱导氧化应激, 使细胞受到氧化损伤, 同时产生炎症。因此, 将氧化应激和炎症与柴胡成分结合用于综合评价柴胡质量, 具有高度的代表性。故本研究对不同批次柴胡中的柴胡皂苷 a、d 含量及 COX-2 的生物效价和抗氧化效果进行测定^[13], 通过 Logistic 算法建立模型并进行验证。本课题组前期对相关药材等级评价^[14-16]积累了丰富经验, 建立了以“成分-体外效价-等级品质”网络为反映体系的分级体制^[17-18], 可对不同产地来源的柴胡进行等级分类, 为柴胡质量评价研究提供依据; 并开发出一种柴胡质量等级快速评价的计算器插件, 为拓宽中药质量等级快速评价方法提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; FW-400AD 型高速万能粉碎机, 天津鑫博得仪器有限公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Multiskan Go 酶标仪, 美国赛默飞世尔公司; Sartorius CPA225D 十万分之一电子天平, 德国赛多利斯科学仪器有限公司。

1.2 材料

对照品柴胡皂苷 a (批号 110777-201912, 质量分数 $\geq 98\%$)、柴胡皂苷 d (批号 110778-201912, 质量分数 $\geq 98\%$), 购自中国食品药品检定研究院; 总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 法)、羟自由基

(OH·) 测试试剂盒、DPPH 自由基 (DPPH·) 清除能力试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所; COX-2 抑制剂筛选试剂盒, 购自上海碧云天生物技术有限公司。柴胡主要收集于陕西省, 经陕西中医药大学白吉庆副教授鉴定为伞形科植物柴胡 *B. chinense* DC. 的干燥根, 具体信息见表 1。

表 1 各批次柴胡信息

Table 1 BR information for each batch

编号	产地	等级
S1	陕西省宝鸡市立远村	统货
S2	陕西省宝鸡市陈仓区拓石镇	统货
S3	陕西省延安市宝塔区	统货
S4	陕西省咸阳市彬县	统货
S5	陕西省宝鸡市陈仓区	选货
S6	陕西省延安市子长市涧峪岔	选货
S7	陕西省宝鸡市金台区	统货
S8	陕西省咸阳市泾阳县	统货
S9	陕西省宝鸡市陈仓区拓石镇九峰村	选货
S10	陕西省咸阳市礼泉县	选货
S11	陕西省宝鸡市太白县	统货
S12	陕西省渭南市潼关县	选货
S13	陕西省延安市吴起县	选货
S14	陕西省宝鸡市陈仓区县功镇	统货
S15	陕西省延安市子长市	选货

按照《中药材商品规格等级标准编制通则》中柴胡的规格等级分类^[19]

the specification grade classification of BR is according to *Chinese Herbal Medicine Commodity Specification Grade Standard Preparation General Rule*^[19]

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备^[1] 将药材粉碎, 过四号筛, 精密称定 0.50 g 药粉, 加入含有 5% 浓氨水的甲醇溶液 25 mL, 超声 30 min, 滤过, 滤液用 25 mL 甲醇洗涤药渣 2 次, 合并滤液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 定容至 5 mL 量瓶中, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定柴胡皂苷 a 或 d 适量, 加甲醇溶解, 分别制成含 1.03 mg/mL 柴胡皂苷 a 及 1.08 mg/mL 柴胡皂苷 d 的溶液, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent 5 TC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水-乙腈, 梯度洗脱: 0~50 min, 25%~90% 乙腈; 50~55 min, 90% 乙腈; 55~57 min, 90%~25% 乙腈; 进样体积 10 μL; 体积分

量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 210 nm。柴胡皂苷 a、d 对照品及柴胡样品的色谱图见图 1。

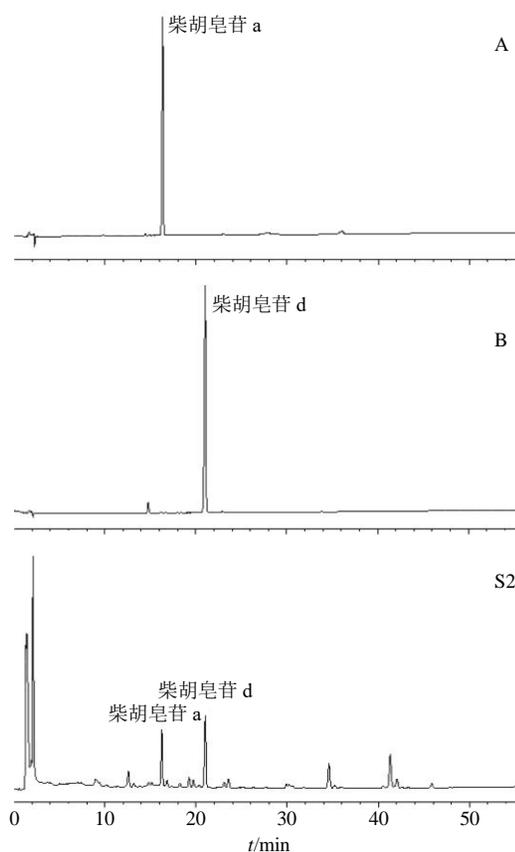


图 1 柴胡皂苷 a (A)、柴胡皂苷 d (B) 和柴胡样品 (S2) 的色谱图
Fig. 1 Saikosaponin a (A), saikosaponin d (B) reference substances and BR sample (S2) chromatograms

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密移取“2.1.2”项下柴胡皂苷 a、d 的对照品溶液, 稀释成 2、4、8、16、32 倍, 按“2.2”项下色谱条件进样测定。以进样量为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归分析。所得柴胡皂苷 a 回归方程为 $Y=2702 X+105.2$, $r=0.999 9$, 表明线性关系良好, 线性范围 0.032~1.030 mg/mL; 柴胡皂苷 d 回归方程为 $Y=3020 X+63.75$, $r=0.999 8$, 表明线性关系良好, 线性范围 0.033~1.080 mg/mL。

2.3.2 精密度考察 吸取“2.1.2”项下对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续测定 6 次, 结果显示柴胡皂苷 a、d 峰面积 RSD 分别为 0.22%、0.63%, 表明该仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性考察 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液 (S2), 分别于制备后 0、4、8、12、16、24 h 时, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面

积,结果显示间隔进样所测得柴胡皂苷 a、d 峰面积的 RSD 分别为 2.00%、2.94%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好

2.3.4 重复性考察 按“2.1.1”项下方法制备 6 份供试品溶液(S2),按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示柴胡皂苷 a、d 峰面积的 RSD 分别为 1.46%、2.31%,表明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率考察 取柴胡皂苷 a、d 含有量已知的同一批样品(S2)约 1 g,称取 6 份,精密称定,分别加入与样品中柴胡皂苷 a、d 含量相等的对照品,再按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,记录峰面积,计算加样回收率。测得柴胡皂苷 a、d 的平均加样回收率分别为 98.90%、100.17%,RSD 分别为 2.35%、2.27%,表明回收率良好。

2.4 含量测定

各批次柴胡,按“2.1.1”项下制样方法平行制备 3 份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,计算柴胡皂苷 a、d 的含量。各批次柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量见表 2。除 S15 批次柴胡外,其他所有批次柴胡皂苷 a、d 含量均符合《中国药典》2020 年版的规定。

表 2 各批次柴胡皂苷含量

Table 2 Saikosaponin contents of each batch

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)		样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)	
	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d		柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d
S1	6.32±0.33	5.41±0.46	S9	6.90±0.31	7.02±0.35
S2	10.30±0.89	11.76±0.77	S10	1.20±1.53	3.48±0.39
S3	2.20±0.11	0.87±0.06	S11	9.04±0.26	8.92±0.78
S4	3.78±0.14	1.06±0.09	S12	6.09±0.36	5.12±0.60
S5	3.73±0.09	2.25±0.23	S13	0.88±1.10	2.14±1.33
S6	7.53±0.28	7.92±0.73	S14	1.96±2.52	5.56±0.75
S7	6.67±0.23	7.59±0.50	S15	0.41±0.02	0.20±0.02
S8	3.71±0.32	3.98±2.17			

2.5 柴胡抑制 COX-2 活性评价

2.5.1 对照品溶液的制备 精密移取 COX-2 试剂盒中塞来昔布适量,加 COX-2 试剂盒中缓冲液溶解,用缓冲液将阳性对照品塞来昔布稀释成 6.25、12.5、25、50、100 nmol/L 的溶液作为对照品溶液。

2.5.2 供试品溶液制备 各批次柴胡药材按“2.1.1”项下方法制备,所得溶液于水浴锅上挥干(温度不高于 60 ℃)。精密加入 1 mL COX-2 试剂盒中的缓

冲溶液溶解,3500 r/min 离心 10 min 得柴胡提取液,并用缓冲溶液逐级稀释,剂间比 2。

2.5.3 量效考察 用缓冲溶液稀释“2.5.2”项下制备的 S2 柴胡的供试品溶液 6 次,剂间比 2,质量浓度依次为 100、50、25、12.5、6.25、3.125 mg/mL。将此 6 个质量浓度样品按照 COX-2 试剂盒说明书方法平行测定 3 次(C-1~3),结果见图 2。由图 2 结果可知,柴胡(S2)提取液质量浓度在 3.125~25 mg/mL 时,对 COX-2 抑制作用具有明显的剂量相关性,且测定结果的重复性较好。样本对 COX-2 酶活性的抑制率计算公式如下。

$$\text{抑制率} = (\text{酶活性对照荧光} - \text{样品荧光}) / (\text{酶活性对照荧光} - \text{空白对照荧光})$$

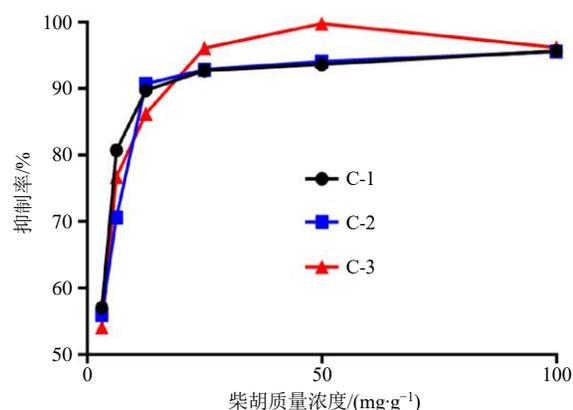


图 2 柴胡(S2)对 COX-2 抑制作用量效关系

Fig. 2 Dose-effect relationship of COX-2 inhibition by BR (S2)

2.5.4 生物效价计算方法 根据试剂盒说明书方法测定,计算每个样品孔和空白对照孔的平均荧光值,依据荧光值的变化,计算每个样品不同浓度的抑制率。设定塞来昔布对照品的参比效价值为 1000 U,将供试品测试质量浓度和相应的抑制率输入生物效价计算软件(TDM),计算不同产地柴胡样品对 COX-2 的生物效价。

2.5.5 不同批次柴胡样品对 COX-2 生物效价测定 将 15 批柴胡样品按“2.5.2”项下方法制备并稀释,严格按照试剂盒说明书操作测定,按照“2.5.4”项下方法计算柴胡对 COX-2 的生物效价,结果见表 3。

2.6 柴胡抗氧化活性测定

2.6.1 供试品溶液制备 参照“2.1.1”项方法制备。

2.6.2 抗氧化能力测定 参考谈利红等^[20-21]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 OH·的清除率,结果见表 4。

表3 不同批次柴胡对 COX-2 的生物效价 (n = 3)

Table 3 Bioactivity of COX-2 by different batches of BR (n = 3)

样品	平均生物效价/U	样品	平均生物效价/U
S1	14.30	S9	8.17
S2	54.52	S10	3.36
S3	25.34	S11	41.63
S4	13.69	S12	95.49
S5	92.51	S13	8.55
S6	49.57	S14	27.11
S7	15.47	S15	84.27
S8	23.50		

表4 不同批次柴胡对 ABTS⁺、DPPH·和 OH·的清除率 (n = 3)

Table 4 Inhibition rate of ABTS⁺, DPPH· and OH· by different batches of BR (n = 3)

样品	平均抑制率/%			样品	平均抑制率/%		
	ABTS ⁺	DPPH·	OH·		ABTS ⁺	DPPH·	OH·
S1	32.92	22.54	42.37	S9	31.64	22.37	39.77
S2	33.78	37.17	23.76	S10	36.42	38.18	42.94
S3	36.43	35.40	26.68	S11	36.06	33.88	38.33
S4	32.32	57.08	17.78	S12	33.29	33.54	32.39
S5	33.61	15.54	47.21	S13	32.36	30.46	36.68
S6	36.14	37.76	25.26	S14	35.14	30.70	29.83
S7	33.42	23.58	30.10	S15	29.27	26.82	26.98
S8	31.60	23.80	26.27				

由表2~4可知,柴胡皂苷 a、d 含量最高的,其 COX-2 生物效价以及抗氧化活性并非最高,不能完全通过柴胡皂苷 a、d 含量的高低评价药材质量的优劣,故本研究采用成分-药效相联合的方式综合评价药材质量。

2.7 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

PCA 是一种应用十分普遍的线性降维算法。它是在原有 n 维特征的基础上重建的 k 维特征,在损失最少信息的前提下把多个指标转化为几个综合指标的多元统计方法^[22]。将不同批次柴胡的柴胡皂苷 a、d 的含量、COX-2 生物效价和抗氧化活性数据进行标准化处理后,导入 Simca-p 14.1 软件,以柴胡皂苷 a、d 含量,COX-2 生物效价,OH·抑制率,ABTS⁺抑制率及 DPPH·抑制率这 6 个影响因素作为观测值 (X) 进行 PCA。提取前 2 个主成分得到模

型拟合度为 92.34%,说明模型拟合能力良好,各主成分贡献率见表 5。PCA 将各批次柴胡药材分组得到散点图 (图 3)。对各批数据进行层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA, 图 4)。样本被自动分为 5 类,柴胡各等级间有明显的分类距离。S2、S6、S11 被归为一类, S14、S3、S8、S7 被分为一类, S1、S9、S13、S10 被分为一类, S12、S5、S15 被归为一类, S4 被分为一类。结果表明,采用 PCA 的分类分析具有较高的可靠性。

表5 各主成分贡献率

Table 5 Contribution rate of each principal component

主成分	累积贡献率/%	主成分	累积贡献率/%
1	0.799 959	4	0.984 039
2	0.923 378	5	0.998 204
3	0.964 728		

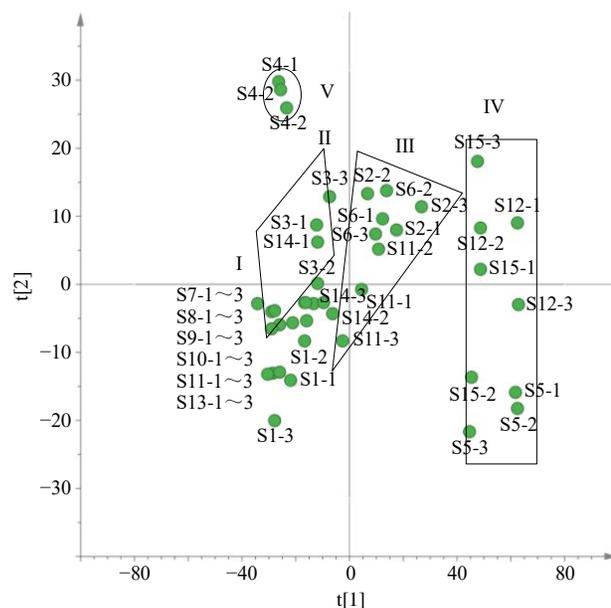


图3 PCA 散点图

Fig. 3 PCA-scores plot

2.8 柴胡等级预测

2.8.1 Logistic 模型建立^[14-16] 令 $Y=1, 2, 3, 4$, 表示柴胡药材的 4 个等级。常用的 Logistic 回归模型: $\ln[q_i/(1-q_i)] = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n$, β_0 为截距, $i=1, 2, 3, 4$; β_1, \dots, β_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 $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_n$, 从而柴胡投料药材各等级的概率 P 表达式如下: $P_i = \exp(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n) / [1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n)]$ 。对于自变量 x_1, \dots, x_n , 由方程可以预测 $q_1 \sim q_3$, 再由 $P(y=1) = q_1, P(y=2) = q_2 - q_1, P(y=3) = q_3 - q_2$ 预测柴胡等级概率。

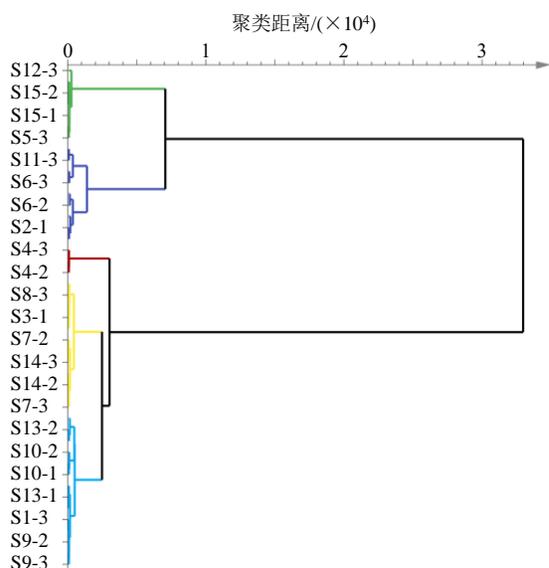


图4 HCA 聚类图

Fig. 4 HCA clustering diagram

2.8.2 模型拟合 运用 Logistic 模型对柴胡的数据进行回归拟合, 根据不同批次柴胡样品的柴胡皂苷含量和生物活性指标测定结果, 将 15 批实验数据集按照 7:3 比例分成训练集 (S3、S6、S5、S7、S8、S9、S10、S11、S13、S15) 和测试集 (S1、S2、S4、S12、S14)。所得概率公式对测试集进行分类, 分类标准为 $P \geq 85\%$ 。各个拟合批次均属于相应等级, 表明结果具有高度稳定性。各等级判断见表 6。

表 6 各批次柴胡等级

Table 6 BR grade of each batch

样品	P 值	等级	中部直径/cm	样品	P 值	等级	中部直径/cm
S1	1.00	中	0.39	S9	0.99	中	0.42
S2	1.00	优	0.40	S10	0.99	中	0.46
S3	0.99	良	0.35	S11	0.99	优	0.44
S4	0.90	优	0.28	S12	0.99	优	0.47
S5	1.00	中	0.45	S13	1.00	差	0.60
S6	0.99	优	0.40	S14	1.00	差	0.37
S7	1.00	良	0.35	S15	1.00	差	0.44
S8	1.00	良	0.37				

2.9 柴胡等级的预测模型建立

将实测的柴胡成分含量以及生物活性数据经 SPSS 25 处理后, 实现 Logistic 模型参数的求解, 得到模型表达式: $P_{\text{优}} = \exp(-111.127 + 8.327 \times \text{柴胡皂苷 a 含量} + 1.540 \times \text{柴胡皂苷 d 含量} - 0.788 \times \text{ABTS}^+ + 1.717 \times \text{DPPH} \cdot + 0.088 \times \text{OH} \cdot + 0.428 \times \text{COX}) / [1 + \exp(-111.127 + 8.327 \times \text{柴胡皂苷 a 含量} +$

$1.540 \times \text{柴胡皂苷 d 含量} - 0.788 \times \text{ABTS}^+ + 1.717 \times \text{DPPH} \cdot + 0.088 \times \text{OH} \cdot + 0.428 \times \text{COX})]$, $P_{\text{良}} = \exp(531.191 + 14.876 \times \text{柴胡皂苷 a 含量} - 16.305 \times \text{柴胡皂苷 d 含量} + 7.713 \times \text{ABTS}^+ - 8.315 \times \text{DPPH} \cdot - 15.988 \times \text{OH} \cdot - 3.676 \times \text{COX}) / [1 + \exp(531.191 + 14.876 \times \text{柴胡皂苷 a 含量} - 16.305 \times \text{柴胡皂苷 d 含量} + 7.713 \times \text{ABTS}^+ - 8.315 \times \text{DPPH} \cdot - 15.988 \times \text{OH} \cdot - 3.676 \times \text{COX})]$, $P_{\text{中}} = \exp(-511.624 - 4.430 \times \text{柴胡皂苷 a 含量} - 0.422 \times \text{柴胡皂苷 d 含量} - 6.238 \times \text{ABTS}^+ - 6.106 \times \text{DPPH} \cdot + 12.834 \times \text{OH} \cdot - 0.924 \times \text{COX}) / [1 + \exp(-511.624 - 4.430 \times \text{柴胡皂苷 a 含量} - 0.422 \times \text{柴胡皂苷 d 含量} - 6.238 \times \text{ABTS}^+ - 6.106 \times \text{DPPH} \cdot + 12.834 \times \text{OH} \cdot - 0.924 \times \text{COX})]$, $P_{\text{差}} = \exp(1\ 253.319 - 111.641 \times \text{柴胡皂苷 a 含量} - 12.988 \times \text{柴胡皂苷 d 含量} - 2.283 \times \text{ABTS}^+ - 15.719 \times \text{DPPH} \cdot - 11.627 \times \text{OH} \cdot - 2.489 \times \text{COX}) / [1 + \exp(1\ 253.319 - 111.641 \times \text{柴胡皂苷 a 含量} - 12.988 \times \text{柴胡皂苷 d 含量} - 2.283 \times \text{ABTS}^+ - 15.719 \times \text{DPPH} \cdot - 11.627 \times \text{OH} \cdot - 2.489 \times \text{COX})]$, 然后对测试集样本进行分类预测。拟将柴胡不同批次按照优 (I)、良 (II)、中 (III)、差 (IV) 4 个等级分类, 分别赋予响应值 4、3、2、1。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, 所有分级 P 值高达 90% 以上, 表明公式可行。

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, 从而确定投料药材等级。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药材等级分类标准。

2.10 中药材质量等级评价计算机开发

2.10.1 计算器原理 影响药材的因素主要分为 3 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; 第 3 类是指纹图谱中各化合物的组成比例。由于预测模型的建立和参数的确定是由数据驱动, 利用药材分类标准来生成数据作为建模基础。因此, 将优 (I)、良 (II)、中 (III)、差 (IV) 分别赋予响应值 4、3、2、1。

为了筛选稳定的定量指标, 对中药材/饮片进行等级划分。首先采用 PCA 对样本数据进行降维处理。将贡献率高的生物活性指标及化学成分指标作为观测因子。通过采用 PCA 和 HCA 结合的数据处

理技术, 来反映药材/饮片成分和活性差异。根据不同批次药材/饮片活性、成分可以初步观察到药材/饮片的分类情况, 并结合 Logistic 回归方程进行等

级划分。计算公式见“2.9”项。

2.10.2 插件开发结果 根据柴胡等级计算插件开发程序流程如图 5 所示, 对流程中每个步骤进行模

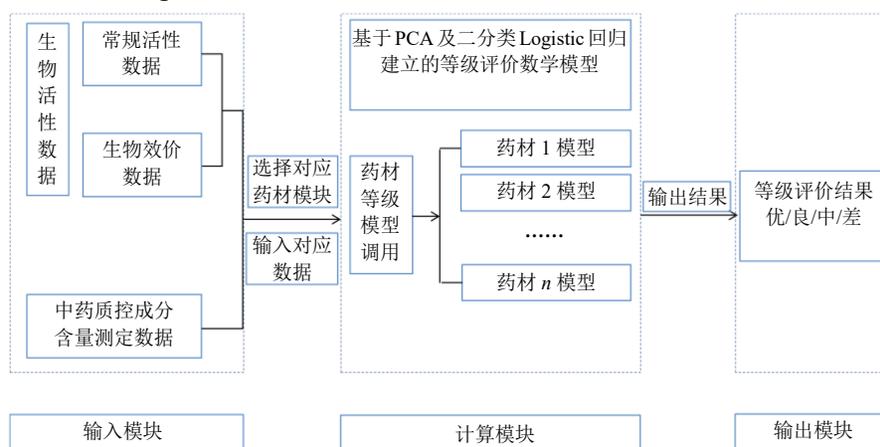


图 5 药材等级计算器使用流程

Fig. 5 Using process of herbal grade calculator

块化的结构设计, 程序结构清晰, 调用方便, 原始数据和输出结果的显示均在视图类中完成。计算器链接如下: <http://cxzx.sntcm.edu.cn/jsq/ranking.html>。

3 讨论

3.1 柴胡等级划分与性状指标的关系

柴胡作为临床常用中药材, 具有较高的药用价值, 但目前记载的柴胡道地产区过多、没有科学指导下培育的移栽品、次品与伪品充之都造成柴胡药材市场上品种混乱, 导致质量参差不齐, 在性状上难以分辨真伪。传统经验鉴别方法是药材鉴别的精髓, 方法虽好, 但需要专业型人才, 而且药材品种繁多, 形态各异, 尤其药材经炮制加工后改变其形状、性味, 使药材更加难以鉴别。因此单纯的依靠传统经验鉴定药材真伪、确定优劣显然是不够可靠。故本实验利用 PCA 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。通过 Logistic 进行分析, 寻找规律建立数学模型, 进而综合评价药材质量。多变量大数据集无疑会为研究和应用提供丰富的信息, 把现代科学和实践经验加以结合, 一定能更好地判断药材的优劣, 弥补传统经验之不足, 保证临床用药安全有效。

3.2 柴胡等级划分与生物活性的关系

质量直接影响中医临床疗效, 故应以“因效而异”为原则对柴胡质量进行评价。但对于柴胡活性成分-药效差异的研究相对较少^[23-25]。目前, 药物主

要成分与活性相结合的研究已成为评价药物品质的方法之一, 故本实验将柴胡成分药效相关联。用于柴胡等级评价。

通过柴胡对 COX-2 的生物效价研究结果显示, 各批次柴胡样品间抗环氧化酶活性差异较大, 柴胡质量浓度在 3.125~25 mg/mL 对 COX-2 抑制作用具有明显的量效关系, 建议增加柴胡抗环氧化酶活性作为柴胡质量的区分要点。Logistic 模型回归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。本研究首次将柴胡中相关有效成分含量与体外效价相关联, 建立柴胡等级分类体系, 具有一定应用价值。同时也存在一定局限性: 样本量少, 柴胡样本量仅限于柴胡道地产区陕西境内; 为进一步完善柴胡等级研究, 后续将扩大样本来源。

3.3 药材等级计算器开发

本计算器基于 JavaScript 的 web 交互跨平台技术, 该应用需求也越来越多, JavaScript 编辑的交互 web 页面改变了传统的 www 访问模式, 它把 JAVA 嵌入在 HTML 中, 无需通用网关接口 (common gateway interface, CGI) 即可实现动态交互, 既能满足用户对灵活性和方便性的要求, 又能对用户提出的要求进行快速响应。因此, 本计算器针对中药等级评价和“成分-功效”关联计算困难的问题, 设计了一种基于 HTML5 的用于中药等级计算的可视化交互系统, 能够快速、高效地进行中药等级计算并输出简明的评价结果。该计算器可独立使用, 也

可作为网络插件嵌入大型运算平台使用。其特点是将多个中药的生物活性数据和质控成分含量数据作为等级评价依据,采用多元回归分析方法联用 Logistic 回归模型,通过大量数据拟合出特定药材的等级评价方程。通过动态地输入测定的数据,可直接经过后台计算最终输出药材的等级评价结果,这样既减少了参数选择的尝试过程,又为准确性提供了保证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 293.
- [2] 孙婷婷, 骆骄阳, 徐媛媛, 等. 柴胡药材质量国际标准化现状概述 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4853-4860.
- [3] Lin M, Zhang W, Su J. Toxic polyacetylenes in the genus *Bupleurum* (Apiaceae)-distribution, toxicity, molecular mechanism and analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 566-573.
- [4] 张好, 卢紫娟, 邢婕, 等. 晋产黑柴胡和北柴胡化学差异比较研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(6): 622-628.
- [5] 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.
- [6] Zhu J, Luo C, Wang P, et al. Saikosaponin a mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF- κ B pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(5): 1345-1350.
- [7] Lu C N, Yuan Z G, Zhang X L, et al. Saikosaponin a and its epimer saikosaponin d exhibit anti-inflammatory activity by suppressing activation of NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(1): 121-126.
- [8] 程玉鹏, 姜丽丽, 王语哲, 等. 柴胡皂苷 a 药理学研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(4): 24-27.
- [9] 马悦, 胡相卡, 赵艳丹, 等. 基于 COX-2 酶活性的柴胡生物质量评价研究 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(3): 91-95.
- [10] 张芬, 王颖楠. 异紫花前胡内酯对妊娠糖尿病大鼠主动脉血管收缩及 AT1R、AT2R、COX-1、COX-2 表达的影响 [J]. 中国药师, 2019, 22(4): 649-655.
- [11] Yang L, Liu J, Qi G. Mechanism of the effect of saikosaponin on atherosclerosis *in vitro* is based on the MAPK signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8868-8874.
- [12] Zhu Y, Chen X, Rao X, et al. Saikosaponin a ameliorates lipopolysaccharide and *d*-galactosamine-induced liver injury via activating LXR α [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 131-137.
- [13] 余刘勤, 贾爱梅, 宋永砚. 柴胡皂苷抗炎、抗氧化和降脂研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(1): 87-92.
- [14] 李晓红, 刘妍如, 唐志书, 等. 基于“生物活性-质量标志物”关联的赤芍饮片等级评价方法研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2611-2617.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 杨洪军, 许海玉. 整合药理学: 元胡止痛方的探索研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 1-232.
- [18] 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.
- [19] 团体标准 TCACM 1021.1-2016《中药材商品规格等级标准编制通则》[S]. 2016: 6.
- [20] 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.
- [21] 周蕙祯, 罗伟, 陈爽, 等. 瑞香狼毒花中香豆素成分及生物活性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 943-950.
- [22] 许彬, 郑链, 王克勇, 等. 基于局域灰度概率分布的小目标检测方法 [J]. 激光与红外, 2005, 35(3): 187-189.
- [23] 孙婷婷. 北柴胡饮片化学成分及质量标准研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
- [24] 刘洁, 周梦鸽, 赵万顺, 等. 不同产地柴胡中柴胡皂苷 a、c、d 及柴胡总皂苷含量分析与比较 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9): 67-71.
- [25] 王瑞, 闫玺镁, 顾超, 等. 多成分指标定量结合指纹图谱分析评价不同产地柴胡的质量 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2522-2525.

[责任编辑 郑礼胜]