

基于“甾酮类化学成分-抗氧化生物活性” 关联分析评价牛膝药材商品等级

常爱冰¹,刘妍如^{1*},王梅^{2*},唐志书¹,宋忠兴¹,史鑫波¹,刘峰³,陈彦斌³

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;

²陕西中医药大学附属医院,咸阳 712083;³陕西步长制药有限公司,西安 710075

摘要:本研究采用 ACQUITY UPLC[®] BEHC₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,以 0.2% 乙酸水溶液(A)-乙腈溶液(B)为流动相进行梯度洗脱,体积流量为 0.3 mL/min,检测波长为 250 nm,在该色谱条件下测定 21 批牛膝药材甾酮类成分含量。并关联生物活性项下的 ABTS 自由基清除率, DPPH 自由基清除率和羟基自由基清除率的结果,最后建立用于等级评价的 Logistic 回归模型。通过该模型,21 批的牛膝药材被分成了优良中差四个等级。研究结果表明,基于二分类 Logistic 回归模型描述牛膝药材等级与影响因素之间的映射关系是可行的,为牛膝药材的质量评价标准的制定提供了新的思路。

关键词:牛膝药材; Logistic 回归; 含量测定; 生物活性; 质量控制; 等级评价

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)10-1737-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.10.015

Commercial grade evaluation of *Achyranthes bidentata* based on "phytoecdysones components-antioxidant biological activity" correlation

CHANG Ai-bing¹, LIU Yan-ru^{1*}, WANG Mei^{2*},

TANG Zhi-shu¹, SONG Zhong-xing¹, SHI Xin-bo¹, LIU Feng³, CHEN Yan-bin³

¹Shaanxi University of Chinese Medicine, 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, Xianyang 712083, China;

²The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China;

³Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710075, China

Abstract: The UPLC chromatographic column was acquity ACQUITY UPLC[®] BEHC₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), with 0.2% acetic acid-acetonitrile as the mobile phases in gradient solvent system. The detection wavelength was set at 250 nm with flow rate of 0.3 mL/min, and phytoecdysones components were determined in the chromatographic conditions. Then the antioxidant biological activity was reflected through ABTS radical scavenging rate, DPPH radical scavenging rate and hydroxyl radical scavenging rate. Finally, a two-classification logistic regression model was based on correlating biological activity and components. All 21 batches of *Achyranthes bidentata* were divided into four grades according to this model. The results showed that it was feasible to describe the mapping relationship between the grade and the influencing factors by this model, which could provide a new idea for the evaluation standard of *A. bidentata*.

Key words: *Achyranthes bidentata*; Logistic regression; content determination; biological activity; quality control; grade evaluation.

收稿日期: 2019-12-03

接受日期: 2020-08-19

基金项目: 陕西省科技厅重点产业链(群)项目(2020ZDLSF05-08); 陕西省高层次人才特殊支持计划 & 青年拔尖人才支持计划(陕组通字[2018]33号); 国家自然科学基金(81773919); 陕西省技术创新引导专项(2018HJCG-21)

* 通信作者 Tel: 86-29-38182207; E-mail: yanzi_2203@aliyun.com, wangm1379@163.com

牛膝来源于苋科植物牛膝(怀牛膝)*Achyranthes bidentata* Bl.的干燥根。具有补肝肾、强筋骨和活血祛瘀等功效^[1],临床上常用于血滞经闭、胞衣不下和跌打损伤等症。现代药理研究表明牛膝具有增强免疫、抗氧化和抗炎镇痛等功能,其机理为抑制自由基的产生^[2-7]。

作为中医临床常用药物之一,其质量优劣直接关系到临床用药的安全性^[8]。目前牛膝药材的质量控制主要参考2015版药典对于蜕皮甾酮含量的规定。中药有别于化学药和生物制品,单一的感官评价、化学评价或生物评价均无法全面反映中药的整体质量和临床功效^[9],多元化的交叉综合评价模式将会成为中药质量评价的趋势^[10]。因此本研究以抗氧化活性作为生物活性指标,同时结合牛膝甾酮类化学成分的含量测定结果。建立一种基于“甾酮类化学成分-抗氧化生物活性”关联研究思路的 Logistic 回归模型,为牛膝药材的质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ACQUITYH-CLASS 型超高效液相色谱仪(美国沃世特公司):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(美国赛默飞世尔公司);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 试剂

对照品 25R-牛膝甾酮(批号 HS94175W2)、25S-牛膝甾酮(批号 H1098998198)均购于宝鸡辰光生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$;对照品 β -蜕皮甾酮(批号 MUST-18120209)购于成都曼思特生物科技有限公司,纯度 $\geq 99\%$;ABTS 自由基试剂盒和羟自由基试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;1,1-二苯基-2-三硝基苯胍购于上海源叶生物科技有限公司;醋酸(色谱纯)购于西格玛奥德里奇上海贸易有限公司;乙腈(色谱纯)购于德国默克公司;水为超纯水,其余试剂为分析纯。

1.3 材料

牛膝药材主要收集于河南、河北、内蒙等地,经陕西中医药大学刘世军副教授鉴定为苋科植物牛膝(怀牛膝)*A. bidentata* Bl.的干燥根,凭证标本存放于陕西中药资源产业化协同创新中心,具体信息见表1。

表1 21批牛膝药材信息

Table 1 Collection information for 21 batches of *A. bidentata*

编号 No.	品名 Name	来源 Provider	凭证标本号 Sample No.
S1	步长	陕西步长制药有限公司	20190101
S2	兴盛德	陕西兴盛德有限公司	20190102
S3	河北	河北定州	20190103
S4	河南	河南武陟	20190104
S5	怀县	河南武陟县	20190105
S6	优	河南温县	20190106
S7	中	河南温县	20190107
S8	良	河南温县	20190108
S9	差	河南温县	20190109
S10	一级河北	河北安国	20181101
S11	二级河北	河北安国	20181102
S12	三级河北	河北安国	20181103
S13	统河北	河北安国	20181104
S14	一级河南	河南焦作	20181105
S15	二级河南	河南焦作	20181106
S16	三级河南	河南焦作	20181107
S17	统河南	河南焦作	20181108

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	品名 Name	来源 Provider	凭证标本号 Sample No.
S18	一级内蒙	内蒙古赤峰	20181109
S19	二级内蒙	内蒙古赤峰	20181110
S20	三级内蒙	内蒙古赤峰	20181111
S21	统内蒙	内蒙古赤峰	20181112

2 方法

2.1 牛膝甾酮类成分含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] BEHC₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.2% 乙酸水溶液(A)-乙腈溶液(B)。梯度洗脱程序为 0~1 min, 2% B; 1~21 min, 2% → 22% B; 21~25 min, 22% → 2% B; 25~28 min, 2% B。体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 进样 2 μL, 检测波长为 250 nm。

2.1.2 溶液制备

2.1.2.1 对照品制备

精密称取 β-蜕皮甾酮、25S-牛膝甾酮、25R-牛膝甾酮对照品, 加甲醇溶解, 制成质量浓度分别为 0.1、0.8、0.1 mg/mL 对照品溶液, 备用。

2.1.2.2 供试品制备

精密称取本品粉末(过三号筛)1 g, 置具塞锥形瓶中, 加水饱和并正丁醇 30 mL。浸泡过夜后超声处理 30 分钟, 过滤, 用甲醇 10 mL 分数次洗涤容器及残渣。合并滤液和洗液, 蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度即得。

2.1.3 含量测定

将“2.1.2.1”项下对照品溶液及“2.1.2.2”项下的供试品溶液, 按照“2.1.1”项下的色谱条件, 分别进样 2 μL 进行含量测定。

2.2 抗氧化生物活性指标测定

2.2.1 ABTS 自由基清除能力的测定

具体操作参照 ABTS 自由基试剂盒说明书, 首先进行标准曲线的绘制得到线性方程为 $Y = -1.6664x + 2.285$, 决定系数 $r = 0.9992$ 。将各批次牛膝的吸光值代入方程即得清除能力(A_1), 同理得出对照溶液的清除能力(A_0)。每个样品设三个复孔, 按公式(1)计算清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

2.2.2 DPPH 自由基清除能力的测定

参考文献^[11]稍作修改, 用无水乙醇将 DPPH 配

成 2 mmol/L 的溶液。实验设空白组、样品组与对照组, 每个样品设三个复孔。样品组中加入 150 μL 的 DPPH 溶液和 150 μL 牛膝各批次提取液(A_1); 空白组中加入 150 μL 的无水乙醇溶液和 150 μL 牛膝各批次提取液(A_2); 对照组中加入 150 μL 的 DPPH 溶液和 150 μL 的无水乙醇溶液(A_0)。混匀, 室温下避光静置 30 min, 用酶标仪测定 517 nm 处吸光值。按公式(2)计算清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

2.2.3 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力的测定

具体操作参考南京建成生物工程研究所提供的羟基自由基试剂盒说明书。分别测定对照品溶液(A_0)与各批次牛膝样品(A_1)吸光度值, 按照公式(3)计算清除率。

$$\text{羟基自由基清除率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

2.3 牛膝药材等级分类

2.3.1 Logistic 回归模型建立

采用 SPSS 22.0 软件建立回归模型。首先通过主成分分析方法找到牛膝药材等级相关的主要影响因素, 该影响因素即为自变量。其次对模型进行拟合, 拟合过程如下: 将 21 批实验数据集分成训练集和测试集两部分, 对训练集样品的自变量数据进行 Logistic 回归分析。最后建立回归模型 $p_i = \exp(\beta_{i0} + \beta_{i1x_1} + \dots + \beta_{inx_n}) / [1 + \exp(\beta_{i0} + \beta_{i1x_1} + \dots + \beta_{inx_n})]$, 其中 p 为概率值, x_1, \dots, x_n 为自变量。然后根据该模型对测试集样品进行分类预测, 预测结果 $P \geq 0.8$ 则判定为该等级。药材等级赋予响应值 4、3、2、1, 分别代表优(I)、良(II)、中(III)、差(IV)4 个等级。

3 结果

3.3 方法学考察

3.1.1 系统适用性考察

将供试品溶液和对照品溶液分别进样 2 μL, 记录 250 nm 波长下的色谱图。通过比较保留时间和峰面积, 可以看出甾酮类各成分的分离度均符合测定要求, 结果见图 1。

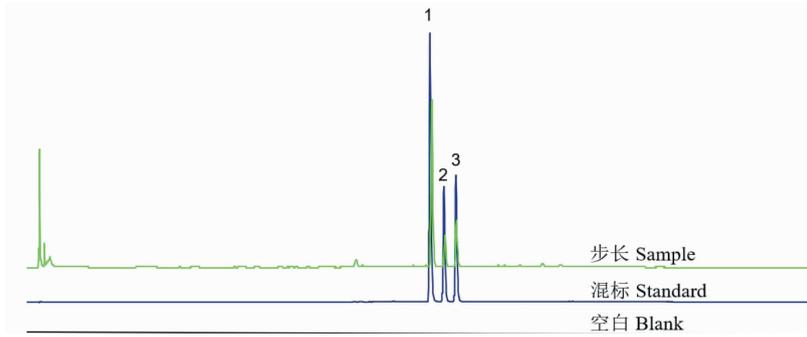


图1 牛膝药材及混合对照品 UPLC 图谱

Fig. 1 UPLC map of *A. bidentata* and its control注:1. β -蜕皮甾酮;2. 25*R*-牛膝甾酮;3. 25*S*-牛膝甾酮。Note:1. β -Ecdysterone;2. 25*R*-Inokosterone;3. 25*S*-Inokosterone.

3.1.2 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液,用甲醇逐级稀释。分别按“2.1.1”项下色谱条件分析,进样量为 2 μ L

测定峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),绘制各标准曲线。结果见表 2,3 个甾酮类成分在各浓度范围内的线性关系良好。

表2 3个甾酮类成分的线性回归方程、相关系数和线性范围

Table 2 Regressive equations, correlation coefficients, linear ranges between three phytoecdysones

成分 Component	回归方程 Regressive equation	r	线性范围 Linear range (μ g/mL)
β -蜕皮甾酮 β -Ecdysterone	$Y = 1.66 \times 10^6 X - 1.1 \times 10^4$	0.999 9	0.2 ~ 6
25 <i>R</i> -牛膝甾酮 25 <i>R</i> -Inokosterone	$Y = 5.97 \times 10^5 X - 1.46 \times 10^4$	0.999 7	0.04 ~ 1
25 <i>S</i> -牛膝甾酮 25 <i>S</i> -Inokosterone	$Y = 1.82 \times 10^6 X - 1.81 \times 10^4$	0.999 1	0.01 ~ 0.3

3.1.3 精密度试验

取混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,重复进样 6 次,考察精密度。结果显示,各甾酮类成分峰面积的 RSD 在 0.69% ~ 1.27% 之间,表明仪器精密度良好。

3.1.4 稳定性试验

按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,每隔 4 小时进样一次,连续进样 24 小时,考察供试品稳定性。结果显示,各甾酮类成分峰面积的 RSD 在 0.86% ~ 1.05% 之间,表明样品在 24 h 内稳定性良好。

3.1.5 重复性试验

按“2.1.2.2”项下的方法平行制备 6 份供试品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件,进行重复性试验。结果显示,各甾酮类成分峰面积的 RSD 在 0.54% ~ 0.87% 之间,表明方法重复性良好。

3.1.6 回收率实验

精密称定已知含量样品约 1 g,共 6 份,分别加入一定量的对照品溶液。按“2.1.2.2”项下的方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,计算加样回收率。结果显示,各甾酮类成分的平均加样回收率在 98.56% ~ 101.38% 之间, RSD 小于 1% ($n=6$),表明方法的准确度良好。结果见表 3。

表3 牛膝加样回收率

Table 3 Results of recovery test

化合物 Component	样品含量 Sample contained (μ g)	对照品含量 Reference contained (μ g)	测得总量 Found amount (μ g)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
β -蜕皮甾酮 β -Ecdysterone	25.06	25.10	50.79	101.36	101.38	0.58
	25.06	25.10	51.07	101.91		

续表 3 (Continued Tab. 3)

化合物 Component	样品含量 Sample contained(μg)	对照品含量 Reference contained(μg)	测得总量 Found amount(μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
25R-牛膝甾酮 25R-Inokosterone	25.06	25.10	50.76	101.30	99.48	0.80
	25.06	25.10	51.01	101.80		
	25.06	25.10	50.91	101.59		
	25.06	25.10	50.26	100.29		
	14.14	14.20	28.52	100.84		
	14.14	14.20	28.18	99.63		
	14.14	14.20	28.08	99.28		
	14.14	14.20	28.15	99.53		
25S-牛膝甾酮 25S-Inokosterone	14.14	14.20	27.83	98.41	98.56	0.34
	14.14	14.20	28.05	99.18		
	7.03	7.00	13.93	99.07		
	7.03	7.00	13.84	98.45		
	7.03	7.00	13.87	98.70		
	7.03	7.00	13.80	98.14		
	7.03	7.00	13.87	98.69		
	7.03	7.00	13.82	98.28		

3.2 甾酮类化学成分含量测定

21 批牛膝甾酮类成分含量测定结果见表 4, 分析结果可知, 甾酮类成分含量均符合药典规定。但不同产地牛膝药材的甾酮类含量有明显的区别, 且

同一产地不同等级牛膝药材含量也有略微不同。与市面上的商品等级分类有明显区别, 说明单靠形色来划分牛膝等级存在一定的不足之处。

表 4 21 批牛膝的甾酮类成分的含量测定结果 ($n=3$)Table 4 Phytoecdysones content determination for 21 batches of *A. bidentata* ($n=3$) (%)

编号 No.	β -蜕皮甾酮 β -Ecdysterone	25R-牛膝甾酮 25R-Inokosterone	25S-牛膝甾酮 25S-Inokosterone
S1	0.40	0.25	0.26
S2	0.42	0.26	0.27
S3	0.39	0.24	0.24
S4	0.61	0.25	0.26
S5	0.51	0.25	0.25
S6	0.45	0.27	0.28
S7	0.52	0.25	0.25
S8	0.41	0.26	0.26
S9	0.40	0.26	0.27
S10	0.44	0.27	0.28
S11	0.36	0.26	0.27
S12	0.31	0.25	0.26
S13	0.39	0.28	0.29
S14	0.45	0.26	0.28

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	β -蜕皮甾酮 β -Ecdysterone	25R-牛膝甾酮 25R-Inokosterone	25S-牛膝甾酮 25S-Inokosterone
S15	0.43	0.26	0.26
S16	0.47	0.26	0.27
S17	0.29	0.26	0.27
S18	0.40	0.26	0.27
S19	0.46	0.25	0.26
S20	0.39	0.24	0.24
S21	0.37	0.24	0.25

3.3 抗氧化生物活性指标测定结果

21 批牛膝药材抗氧化生物活性指标测定结果见表 5。分析结果可知,不同批次样品生物活性均有不同程度的差异。以每批样品中所测抗氧化指标的总和作为牛膝的总生物活性,同理得出总甾酮类

成分含量。由图 2 可知,甾酮类成分含量高的一级河北、统河北、河南差(S10、S9、S13),在抗氧化性测定结果中均是较差的批次。这就表明牛膝药材抗氧化能力与甾酮类成分含量不呈单纯的线性关系。所以仅靠甾酮类成分难以全面反映牛膝整体质量。

表 5 21 批牛膝抗氧化生物活性测定结果($n=3$)Table 5 Antioxidant biological activity for 21 batches of *A. bidentata* ($n=3$)

编号 No.	清除率 Scavenging rate(%)		
	ABTS 自由基 ABTS radical	DPPH 自由基 DPPH radical	羟基自由基 Hydroxyl radical
S1	70.82	47.27	50.90
S2	75.13	42.19	48.95
S3	74.94	51.2	52.89
S4	81.66	50.36	54.39
S5	75.61	46.38	49.41
S6	78.46	40.57	53.73
S7	79.62	45.73	50.80
S8	74.86	51.64	44.80
S9	64.78	37.49	34.91
S10	71.16	36.34	30.01
S11	71.92	30.47	30.08
S12	80.25	43.86	48.04
S13	59.79	36.89	40.91
S14	77.99	52.76	47.22
S15	75.20	40.48	60.45
S16	70.70	42.01	49.40
S17	54.94	29.98	47.34
S18	69.89	47.63	50.97
S19	73.55	30.96	33.92
S20	66.56	32.68	45.25
S21	78.86	42.34	43.87

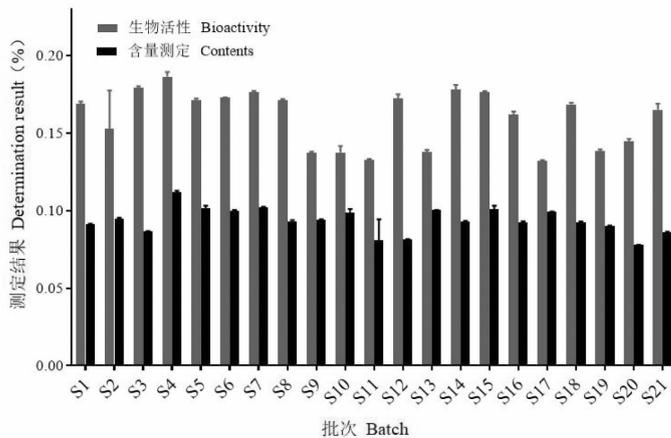


图2 21批牛膝药材的生物活性和含量测定结果

Fig. 2 Contents and biological activity for 21 batches of *A. bidentata*

3.4 牛膝等级划分

3.4.1 主成分分析

PCA 可对多变量的复杂信息进行快速的整合^[12]。本研究将提取的数据 ($n = 3$) 标准化处理后,导入 Simca-p14.1 软件,得到散点图(图 A)。由图可以看出牛膝各批次样品有明显分类,且分类结果与原等级不相符。进而采用 HCA 聚类分析方法对各批数据进行分析,可见等级间有明显的分类距离,结果见(图 B)。由成分载荷图(图 C)可以看出,甾酮类成分和各抗氧化因子是影响牛膝药材等级的主要因素。

3.4.2 等级预测结果

拟合选用的训练集结果如下:优级为河南牛膝(S4)和中牛膝(S7);良级为一级河南(S14)和河北牛膝(S3);中级为一级河北(S10)和二级内蒙(S19);差级为三级内蒙(S20)和河南差级(S9);利用 SPSS 22.0 软件得到模型表达式(见公式 4~7),将测试集实测值代入下式中计算各等级的概率,结果见表 5。

$$P_{\text{优}} = \exp(-109.517 - 2.429 * \text{ABTS} + 0.029 * \text{DPPH} + 1.734 * \cdot \text{OH} + 4686.863 * \beta\text{-蜕皮甾酮含量} + 571.806 * 25R\text{-甾酮含量} - 587.029 * 25S\text{-甾酮含量}) / [1 + \exp(-109.517 - 2.429 * \text{ABTS} + 0.029 * \text{DPPH} + 1.734 * \cdot \text{OH} + 4686.863 * \beta\text{-蜕皮甾酮含量} + 571.806 * 25R\text{-甾酮含量} - 587.029 * 25S\text{-甾酮含量})] \quad (4)$$

$$P_{\text{良}} = \exp(-82.132 + 0.148 * \text{ABTS} + 6.211 * \text{DPPH} - 0.218 * \cdot \text{OH} - 5294.954 * \beta\text{-蜕皮甾酮含量} - 547.849 * 25R\text{-甾酮含量} + 719.112 * 25S\text{-甾酮含$$

$$\text{量}) / [1 + \exp(-82.132 + 0.148 * \text{ABTS} + 6.211 * \text{DPPH} - 0.218 * \cdot \text{OH} - 5294.954 * \beta\text{-蜕皮甾酮含量} - 547.849 * 25R\text{-甾酮含量} + 719.112 * 25S\text{-甾酮含量})] \quad (5)$$

$$P_{\text{中}} = \exp(-246.277 + 2.325 * \text{ABTS} - 7.996 * \text{DPPH} + 0.086 * \cdot \text{OH} + 1896.384 * \beta\text{-蜕皮甾酮含量} + 638.24 * 25R\text{-甾酮含量} + 480.29 * 25S\text{-甾酮含量}) / [1 + \exp(-246.277 + 2.325 * \text{ABTS} - 7.996 * \text{DPPH} + 0.086 * \cdot \text{OH} + 1896.384 * \beta\text{-蜕皮甾酮含量} + 638.24 * 25R\text{-甾酮含量} + 480.29 * 25S\text{-甾酮含量})] \quad (6)$$

$$P_{\text{差}} = \exp(286.408 - 3.501 * \text{ABTS} - 1.775 * \text{DPPH} + 1.739 * \cdot \text{OH} - 2470.817 * \beta\text{-蜕皮甾酮含量} + 146.848 * 25R\text{-甾酮含量} + 53.502 * 25S\text{-甾酮含量}) / [1 + \exp(286.408 - 3.501 * \text{ABTS} - 1.775 * \text{DPPH} + 1.739 * \cdot \text{OH} - 2470.817 * \beta\text{-蜕皮甾酮含量} + 146.848 * 25R\text{-甾酮含量} + 53.502 * 25S\text{-甾酮含量})] \quad (7)$$

4 讨论

4.1 制备方法考察

本研究对制备方法进行了考察,主要考察溶剂种类(正丁醇、乙醇、甲醇)、溶剂浓度(90% 甲醇、80% 甲醇、70% 甲醇)和提取方式(超声提取、回流提取)三个方面。结果表明在提取充分的条件下,“2.1.2.2”项下制备方法便捷且效率高,故选用该制备方法。

4.2 色谱条件的选择

本研究比较了乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈

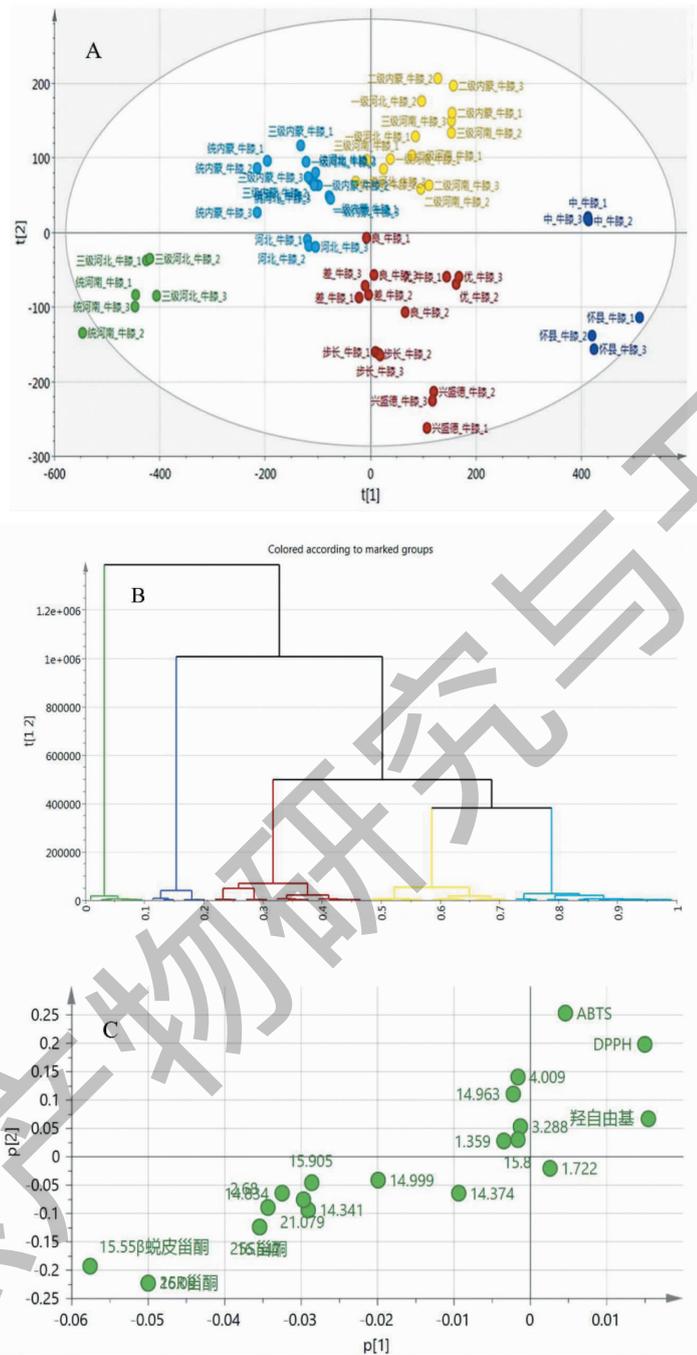


图3 牛膝药材聚类结果

Fig. 3 Clustering results of *A. bidentata*

注:A. PCA 散点图;B. 2HCA-聚类图;C. 成分载荷图。Note: A. PCA scatter diagram; B. HCA-clustering diagram; C. Loading plot.

-0.1% 乙酸水溶液和乙腈-0.2% 乙酸水溶液三种洗脱系统的分离效果。结果表明,选择 0.2% 乙酸-乙腈洗脱系统时,各峰分离度较好且基线平稳,故选择此流动相。考察了美国沃世特公司的 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 和 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7

μm) 两种色谱柱,两种色谱柱出峰灵敏度均较好,但 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱峰形更好,故选择此色谱柱进行色谱分析。在波长方面,PDA 检测器分析结果显示在 250 nm 波长下,各参照峰色谱图信息较为完全。因此,选用 250 nm 作为检测波长。

表6 牛膝药材等级评价结果

Table 6 Grade evaluation results of *A. bidentata*

等级分级结果 Grade	来源/原等级 Provider/ Original Grade	原等级分级标准 Original grading standard	等级分级结果 Grade	来源/原等级 Provider/ Original Grade	原等级分级标准 Original grading standard
4	河南/未分级	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm	3	内蒙/统货	直径、长短不分
4	怀县/未分级	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm	3	河北/三级	0.4 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.6 cm 15 cm ≤ 长度 ≤ 30 cm
4	河南/中	0.4 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.6 cm 15 cm ≤ 长度 ≤ 30 cm	2	河北/一级	0.8 cm ≤ 中部直径 ≤ 1 cm 40 cm ≤ 长度 ≤ 70 cm
4	河南/二级	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm	2	河北/二级	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm
4	河南/三级	0.4 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.6 cm 15 cm ≤ 长度 ≤ 30 cm	2	内蒙/二级	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm
3	河北/未分级	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm	2	河南/优	0.8 cm ≤ 中部直径 ≤ 1 cm 40 cm ≤ 长度 ≤ 70 cm
3	河南/良	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm	1	河南/统货	直径、长短不分
3	河南/一级	0.8 cm ≤ 中部直径 ≤ 1 cm 40 cm ≤ 长度 ≤ 70 cm	1	河南/差	直径、长短不分
3	步长/未分级	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm	1	河北/统货	直径、长短不分
3	兴盛德/未分级	0.6 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.8 cm 30 cm ≤ 长度 ≤ 40 cm	1	内蒙/三级	0.4 cm ≤ 中部直径 ≤ 0.6 cm 15 cm ≤ 长度 ≤ 30 cm
3	内蒙/一级	0.8 cm ≤ 中部直径 ≤ 1 cm 40 cm ≤ 长度 ≤ 70 cm			

4.3 牛膝药材等级评价

2015版《中国药典》规定牛膝中 β -蜕皮甾酮的含量不得低于0.03%。由表3可知,所有药材质量均达标。进一步的主成分分析结果表明,21批牛膝药材质量存在明显差异,且影响因素主要表现在甾酮类成分含量与各抗氧化因子上。在此基础上建立一种基于“甾酮类化学成分-抗氧化生物活性”关联研究的回归模型。通过该模型,21批牛膝药材被分成了优良中差四个等级。其中优级含有二级、三级河南等批次,良级含有一级河南、一级内蒙、三级河北等批次,中级含有一级河北、二级内蒙等批次,差级含有三级内蒙、统货河北与河南等批次,分级结果与商品等级不全一致。目前市场上牛膝的等级主要依靠感官评价和传统经验,主观性较强,难以标准化界定其质量。所以本研究认为基于 Logistic 回归模型能够更好地划分牛膝药材等级。

化学定性鉴别与指标成分检测是现行中药质量控制主要内容,而中药是个复杂的体系,仅以化学成分描述其质量优劣显然不够全面。虽然已有学者建议将生物活性与化学成分关联并用,从而更科学地评价中药的内在质量^[13]。但是目前仍缺乏合理的

关联方案,本研究通过 Logistic 回归模型将“化学成分-生物活性”进行了有效的关联,为牛膝的质量控制与评价提供了新的研究思路。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:11.
- 2 Li JT, Hu ZH, et al. Advances in studies on biology and chemical constituents in Radix Achyranthis Bidentatae [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006, 6: 952-956.
- 3 Ke H, Huang ZZ. Effects of *Achyranthes bidentata* on the activities of nitric oxide synthase and superoxide dismutase in knee joint fluid of OA rabbits [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2014, 25: 2889-2890.
- 4 Wang LJ. Study on the fingerprint of Radix Achyranthis Bidentatae and extraction of *Achyranthes bidentata* saponin together with its pharmacological action [D]. Yangzhou: Yangzhou University (扬州大学), 2009.
- 5 Meng DL. Studies of the constituents and biological activities of *Achyranthes bidentata* Bl. [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学), 2004.

- 6 Lin PD, Peng XP, Liu FY, et al. Study on the mechanism of active components of *Achyranthes bidentata* in prevention and treatment of oste[J]. Rheumat Arthrit(风湿病与关节炎), 2015, 4:56-59.
- 7 Wang HQ, Tang DY, Zhao YR, et al. Effects of *Achyranthes bidentata* polysaccharides on immunity and antioxidation of grass carp[J]. Acta Hydrobiol Sin(水生生物学报), 2013, 37:351-357.
- 8 Hao M, Lu TL, Mao CQ, et al. Study on quality control of Chinese herbal pieces based on Q-marker of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48:1699-1708.
- 9 Jiang ZZ, Wang YF. A pattern of hierarchical progression for quality standard of Chinese materia medica based on "herbal origin-material basis-quality markers-quality control method"[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47:4127-4133.
- 10 Liu CX, Chen SL, Xiao XH, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: quality control for Chinese medicinal products[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47:1443-1457.
- 11 Wang LL. Studies on the chemical constituents *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang[D]. Yanji: Yanbian University(延边大学), 2010.
- 12 Zhong WP, Luo Y, Chen YR. Analysis of chemical composition differences of *Dendrobium* based on two principal component analysis methods[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:2049-2055.
- 13 Li HB, Wu SH, Niu M, et al. History and development of biological assay for quality of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48:2809-2816.

(上接第 1736 页)

- 15 Lee S, Jung SH, Lee YS, et al. Antiinflammatory activity of hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* roots [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27:628-632.
- 16 Liu RH, Kong LY. Study on phenolic constituents of *Aapium aebiferum* leaves[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30:1213-1215.
- 17 Liu HY, Zhu Z, Xiao SJZ, et al. Study on water-soluble chemical constituents of *Syringa oblata*[J]. J Chin Med Mater(中草药材), 2008, 31:998-1000.
- 18 Duan YH, Dai Y, Gao H, et al. Chemical constituents of *Sarandra glabra*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2010, 41(1):29-32.
- 19 Li J, Zhao XM, Wang W, et al. Study on the effect of drying temperature on the content of total flavonoids in petals of *Paeonia suffruticosa*[J]. J Chifeng Univ: Nat Sci(赤峰学院学报: 自科版), 2019, 35(6):27-28.
- 20 Zhang JX, Fan J, Li XY, et al. Study on modern processing method of *Coptidis Rhizoma* based on intrinsic quality[J]. J Liaoning Univ TCM(辽宁中医药大学学报), 2019, 21(9):72-75.