

基于灰色关联度分析法的滇龙胆质量评价

吕伟奇^{1,2}, 张霁^{2,3}, 左智天^{2,3}, 王元忠^{2,3*}, 张庆芝^{1*}

- (1. 云南中医学院 中药学院, 昆明 650500;
2. 云南省农业科学院 药用植物研究所, 昆明 650200;
3. 云南省省级中药原料质量监测技术服务中心, 昆明 650200)

〔摘要〕 目的:测定不同来源滇龙胆样品中 4 种指标成分,结合灰色关联度分析(GRA)法建立其质量评价方法。方法:采用高效液相色谱法测定云南 10 个不同地区的 50 株滇龙胆根及根茎中主要药效成分马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷的含量。基于 GRA 法处理样品各指标成分数据,计算各评价单元序列相对于参考序列的相对关联度作为测度,对样品进行综合评价。结果:建立滇龙胆样品的指纹图谱,并测定出 4 种主要成分的含量。滇龙胆样品的相对关联度 r_i 在 0.306 ~ 0.600,其中 14 个样品的 $r_i > 0.500$,23 个样品的 $r_i < 0.400$,表明样品质量之间存在较大差异。大理鹤庆的 DH3 和 DH5 的 r_i 分别为 0.600 和 0.576,质量最优。不同地区样品 r_i 的平均值在 0.325 ~ 0.541,鹤庆样品 r_i 的平均值最大,质量总体水平最高,可作为优质种源进一步研究和推广。各地区样品 r_i 的 RSD 在 4.4% ~ 11.9%,昆明寻甸样品 r_i 的 RSD 最小,样品最为稳定。结论:GRA 法结合多指标成分定量的评价方法简单、全面,可用于滇龙胆的质量评价,为资源开发利用及优质种源的筛选提供了参考依据。

〔关键词〕 滇龙胆; 灰色关联度分析法; 质量评价
〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2017)13-0066-08
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2017130066
〔网络出版地址〕 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1446.082.html>
〔网络出版时间〕 2017-03-24 14:46

Quality Evaluation of *Gentiana rigescens* by Grey Relational Analysis Method

LYV Wei-qi^{1,2}, ZHANG Ji^{2,3}, ZUO Zhi-tian^{2,3}, WANG Yuan-zhong^{2,3*}, ZHANG Qing-zhi^{1*}

- (1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China;
2. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China;
3. Yunnan Technical Center for Quality of Chinese Materia Medica, Kunming 650200, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To determine the contents of four index components in *Gentiana rigescens* from different sources, and establish a comprehensive method to evaluate the quality of *G. rigescens* based on grey relational analysis (GRA). **Method:** The contents of loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside and sweroside in roots and rhizomes of fifty *G. rigescens* samples from ten different regions of Yunnan Province were detected by high performance liquid chromatography. The relative correlation degree between reference sequence and each evaluation unit sequence was calculated to evaluate the samples synthetically based on the data of index components. **Result:** The fingerprints of *G. rigescens* samples were established, and the contents of the four main components were determined. The relative correlation degree (r_i) of all *G. rigescens* samples was between 0.306 and 0.600, and the r_i was above 0.500 for 14 samples, and below 0.400 for 23 samples, indicating that there were great differences in

〔收稿日期〕 20161214(001)

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81660638,81260608);云南省自然科学基金项目(2013FZ150,2014FD068)

〔第一作者〕 吕伟奇,在读硕士,从事中药资源开发与利用研究,Tel:18487300191,E-mail:lvweiqi1991@126.com

〔通讯作者〕 *王元忠,硕士,副研究员,从事药用植物资源评价研究,Tel:0871-65033575,E-mail:boletus@126.com;

*张庆芝,教授,从事中药资源开发与利用研究,Tel:13888396896,E-mail:ynkzqz@126.com

quality of samples. The r_i was 0. 600 and 0. 576 respectively for DH3 and DH5 from Dali Heqing, which showed optimal quality. The average values of r_i for the samples from different regions were between 0. 325 and 0. 541 , and the average value was maximum for Heqing samples, indicating that the overall quality of Heqing samples was highest, which could be used as excellent resources for further research and extension. The RSD values of r_i for samples from different regions were between 4. 4% and 11. 9% . The RSD value of r_i for Kunming Xundian samples was minimum, indicating that Xundian samples had the most stable quality. **Conclusion:** The evaluation method with combination of GRA method and multi-ingredient quantification was simple and comprehensive to evaluate the quality of *G. rigescens*, and could provide references for the development and utilization of resources as well as optimal resources screening.

[**Key words**] *Gentiana rigescens*; grey relational analysis method; quality evaluation

根据《中国植物志》中记载,滇龙胆又称坚龙胆、青鱼胆,为龙胆科多年生草本植物,分布于云南、四川、贵州、湖南、广西等地区^[1],是 2015 年版《中国药典》中药龙胆的基源植物之一,主要以其干燥根及根茎入药,是龙胆泻肝片、龙胆注射液等多种中成药的原料,在民间广泛应用于治疗咳嗽、黄疸、肝胆疾病等^[2-5]。现代植物化学和药理学研究表明,环烯醚萜类物质是龙胆属药用植物的主要活性成分,含量丰富^[6-7]。马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷为其主要药效成分,具有抗菌消炎、保肝利胆、健胃、抗肿瘤等作用^[8-12],是滇龙胆评价的重要指标。例如,PAN 等^[13]采用响应面法优化滇龙胆根及根茎中龙胆苦苷等 4 种成分的提取方法,建立超高效液相色谱法准确测定各成分含量,为其资源的合理利用提供依据。相比 2015 年版《中国药典》中以龙胆苦苷含量为单一指标的评价模式^[5],对 4 种环烯醚萜类成分的定性和定量分析已成为滇龙胆质量研究的基础^[14-16]。但滇龙胆的前期研究主要是对各成分含量的逐一分析,综合各指标成分进行质量评价的报道较少。

灰色关联度分析 (grey correlation analysis, GRA) 法为灰色理论基本内容,主要针对信息不完全、机制不明确的灰色系统,依据数据序列曲线的相似程度分析因子间的关联程度,实现对系统的预测、决策等功能^[17-18]。目前,该方法已广泛应用于经济评估^[19]、材料设计优化^[20]、农业资源开发^[21]、多目标决策方法研究^[22-23]等领域,在中药研究^[24-26]方面也有报道。该方法在中药质量评价中的应用,主要是基于中药样本各指标成分定量数据,建立灰色关联度评价模型,计算评价单元序列与参考序列间的相对关联度,对评价单元进行排序,获得评价结果。李硕等^[27]测定商品防风中升麻苷、升麻素等 6 种主要成分含量,基于 GRA 法对商品

防风进行等级划分和综合评价,评价结果与商品等级划分情况相符。WANG 等^[28]测定发汗处理的玄参中玄参苷等 12 种活性成分含量,应用 GRA 法评价不同发汗方法处理的玄参,判断最佳处理方法为 30 ℃ 烘干并发汗 3 d。研究证明,该方法对研究中药质量具有较好效果^[29-30],可以尝试应用于滇龙胆质量评价。

本研究以滇龙胆的根及根茎为研究对象,采用高效液相色谱法测定样品中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷含量,结合 GRA 法,以相对关联度为测度,对样品进行综合评价,以期为滇龙胆资源开发及优质种源筛选提供参考依据。

1 材料

所有滇龙胆于 2012 年 12 月至 2013 年 2 月间采集自云南 10 个不同地区,经云南省农业科学院药用植物研究所金航研究员鉴定为滇龙胆 *Gentiana rigescens* 的干燥根及根茎,样品信息见表 1。实验取每株滇龙胆的根及根茎作为样品,烘干至恒重,粉碎后过筛,密封避光保存。

表 1 滇龙胆样品信息
Table 1 Information of Gentianae Radix et Rhizoma samples

No.	产地
NL1 ~ NL5	怒江州兰坪县
DW1 ~ DW5	迪庆州维西县
DH1 ~ DH5	大理州鹤庆县
DY1 ~ DY5	大理州宜川县
CD1 ~ CD5	楚雄州大姚县
CN1 ~ CN5	楚雄州南华县
KS1 ~ KS5	昆明市西山区
KX1 ~ KX5	昆明市寻甸县
QM1 ~ QM5	曲靖市马龙县
QZ1 ~ QZ5	曲靖市沾益县

对照品马钱苷酸(中国食品药品检定研究院,批号 111865-201403,纯度 94.7%),獐牙菜苦苷(上海士锋生物科技有限公司,批号 B11001,纯度 98.0%),龙胆苦苷(中国食品药品检定研究院,批号 110770-201515,纯度 99.1%),当药苷(上海士锋生物科技有限公司,批号 B11118,纯度 98.0%);甲醇和乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);其余试剂均为分析纯。

1260 型 Infinity 高效液相色谱仪,包括 Technologies 色谱工作站,G1311C Quat Pump VL 四元梯度泵带脱气机,G1315D DAD VL 检测器,G1329B ALS 自动进样器(美国安捷伦科技有限公司);AR1140 型 1/1 万电子天平(美国奥豪斯公司);UPTL-II-40L 型超纯水处理系统(成都优普电子产品有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Intersil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm,日本 GL Sciences 公司),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~2.5 min,93%~90% A;2.5~20 min,90%~74% A;20~29.02 min,74%~41.7% A;29.02~30 min,

41.7%~10% A,保持 4 min),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 5 μL,检测波长 241 nm。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 精密称取马钱苷酸 8.0 mg,獐牙菜苦苷 7.0 mg,龙胆苦苷 36.0 mg 和当药苷 7.0 mg,置于同一 10 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,制备得到混合对照品储备溶液,4 ℃避光保存。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取样品粉末(过 80 目筛)0.025 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 1.5 mL,摇匀,称定质量,超声提取 40 min(功率 150 W,工作频率 55 kHz),取出冷却至室温,再称定质量,用 80% 甲醇补足减少质量,取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 取混合对照品溶液,应用倍比稀释法稀释,制备 6 个不同质量浓度混合对照品溶液。按设定色谱条件检测,以对照品质量浓度为横坐标,色谱峰峰面积为纵坐标,考察线性关系。以 3 倍基线噪音时溶液浓度为检测限(LOD),10 倍基线噪音时溶液浓度为定量限(LOQ),见表 2。

表 2 马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷的线性关系、检测限及定量限

Table 2 Linear relation, LOD and LOQ of loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside and sweroside

成分	回归方程	r	线性范围/μg	检测限/mg·L ⁻¹	定量限/mg·L ⁻¹
马钱苷酸	$Y = 7.012 \times 10^3 X + 42.82$	0.999 9	32.3~392.0	3.8	12.5
獐牙菜苦苷	$Y = 8.213 \times 10^3 X + 18.28$	0.999 9	3.6~90.4	1.4	4.8
龙胆苦苷	$Y = 5.745 \times 10^3 X + 192.32$	0.999 7	101.7~3 600.0	50.9	169.5
当药苷	$Y = 4.332 \times 10^3 X + 6.37$	0.999 9	1.8~117.6	1.2	4.0

2.3.2 精密度试验 取同一样品(NL1)供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续重复进样 6 次,测得马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷的峰面积,RSD 分别为 0.3%,2.2%,0.2%,0.6%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取 NL1 样品供试品溶液,分别在 0,2,4,8,16,24 h 按 2.1 项下色谱条件测定,测得马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷峰面积的 RSD 分别为 1.0%,2.3%,1.2%,2.5%,结果显示供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 精密称取 NL1 样品粉末 6 份,每份 0.025 g,按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,测得马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷含量的 RSD

分别为 2.0%,3.9%,2.4%,1.6%,表明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 称取已知马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷含量的同一滇龙胆样品(NL1)9 份,每份 0.025 g,分别按照样品中 4 种成分质量分数的 50%,100%,150% 加入对照品溶液,按设定色谱条件检测。结果回收率在 95.53%~104.82%,RSD 1.0%~2.6%,证明方法准确性高。

2.4 滇龙胆样品 4 种活性成分含量测定 按 2.2.2 项下方法制备滇龙胆样品供试品溶液,并按设定色谱条件检测。建立滇龙胆样品的指纹图谱及对照指纹图谱 R,共标定 7 个共有峰,与对照品比对可知,峰 2 为马钱苷酸,峰 5 为獐牙菜苦苷,峰 6 为龙胆苦苷,峰 7 为当药苷,见图 1,2。采集 4 种活性

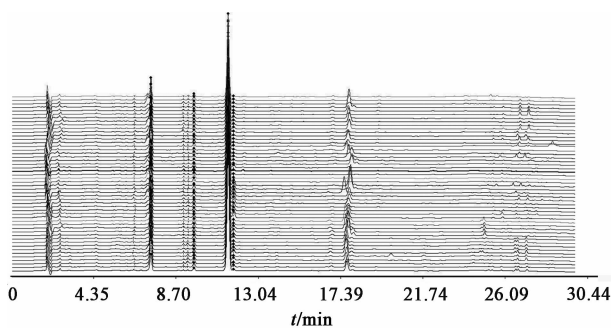


图1 50个滇龙胆样品 HPLC 指纹谱

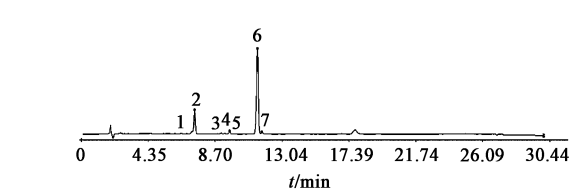
Fig. 1 HPLC fingerprints of 50 batches Gentianae Radix et Rhizoma samples

表 3 滇龙胆样品 4 种活性成分质量分数

Table 3 Content of four main active components of Gentianae Radix et Rhizoma samples					%				
No.	马钱苷酸	獐芽菜苦苷	龙胆苦苷	当药苷	No.	马钱苷酸	獐芽菜苦苷	龙胆苦苷	当药苷
NL1	0.527	0.084	5.194	0.097	CN1	0.681	0.111	4.220	0.089
NL2	1.109	0.125	5.648	0.126	CN2	0.973	0.153	4.323	0.064
NL3	0.891	0.149	5.292	0.090	CN3	0.327	0.114	4.149	0.070
NL4	0.983	0.128	5.115	0.150	CN4	0.586	0.114	4.042	0.099
NL5	0.791	0.085	4.705	0.047	CN5	0.819	0.135	4.369	0.164
DW1	0.694	0.113	6.231	0.153	KS1	0.495	0.037	3.143	0.059
DW2	0.715	0.105	5.623	0.126	KS2	0.604	0.040	3.085	0.067
DW3	0.928	0.126	6.324	0.100	KS3	1.133	0.039	3.208	0.063
DW4	0.471	0.060	5.740	0.098	KS4	0.897	0.048	2.696	0.044
DW5	0.797	0.112	5.804	0.133	KS5	0.904	0.024	2.947	0.042
DH1	0.956	0.093	5.208	0.097	KX1	0.841	0.093	3.608	0.058
DH2	1.256	0.110	5.230	0.168	KX2	0.840	0.076	3.631	0.061
DH3	1.614	0.154	5.265	0.132	KX3	0.882	0.075	3.711	0.056
DH4	0.831	0.171	5.566	0.081	KX4	0.909	0.040	3.358	0.065
DH5	0.980	0.189	5.358	0.141	KX5	0.642	0.058	3.943	0.062
DY1	0.644	0.076	3.066	0.404	QM1	0.386	0.062	3.672	0.093
DY2	0.775	0.056	2.699	0.238	QM2	0.847	0.081	3.649	0.099
DY3	0.653	0.068	2.554	0.218	QM3	0.543	0.064	3.543	0.099
DY4	0.531	0.088	2.627	0.263	QM4	0.688	0.061	3.515	0.094
DY5	0.705	0.108	2.998	0.381	QM5	0.868	0.092	3.525	0.110
CD1	1.279	0.073	3.495	0.396	QZ1	0.425	0.074	3.450	0.037
CD2	1.331	0.095	3.771	0.437	QZ2	0.264	0.071	3.669	0.055
CD3	0.943	0.069	3.633	0.346	QZ3	0.789	0.073	3.706	0.066
CD4	1.452	0.116	3.417	0.393	QZ4	0.467	0.107	3.630	0.081
CD5	1.034	0.048	3.522	0.474	QZ5	0.370	0.067	3.756	0.049

2.5 GRA 法评价

2.5.1 选择参考序列 采用 GRA 法评价样品,应首先确定评价单元序列和参考序列^[26]。设评价单元序列由 m 个样品和 n 个评价指标组成,即 $\{X_{ik}\}$ ($i=1,2,3\cdots m;k=1,2,3\cdots n$)。参考序列包括最优和最差参考序列,最优参考序列各项评价指标为 m 个样品对应评价指标的最大值,即 $\{X_{sk}\}$ ($\{X_{sk}\}=\max\{1\leqslant s\leqslant m\}\{X_{ik}\}$),最差参考序列各项评价指标为 m 个样品对应评价指标的最小值,即 $\{X_{tk}\}$



2. 马钱苷酸; 5. 獐芽菜苦苷;6. 龙胆苦苷; 7. 当药苷

图2 滇龙胆样品 HPLC 对照指纹谱

Fig. 2 HPLC Reference fingerprint of Gentianae Radix et Rhizoma samples

成分色谱数据,结合回归方程计算马钱苷酸、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷含量,结果见表 3。

($\{X_{tk}\}=\min\{1\leqslant t\leqslant m\}\{X_{ik}\}$)。

2.5.2 原始数据无量纲化 原始数据包括多个评价指标,测度单位不统一,不利于各评价单元间的比较,可以采用均值化方法进行无量纲化处理^[27],计算公式为:

$$Y_{ik}=\frac{X_{ik}}{X_k}$$

(1)

(Y_{ik} 为处理后的数据, X_{ik} 为样本数据, X_k 为第 k 个评价指标的均值)。

2.5.3 计算关联系数 相对于最优参考序列,各评价单元的关联系数计算公式为:

$$\xi_{k(s)}^i = \frac{\Delta_{\min} + \rho\Delta_{\max}}{|Y_{ik} - Y_{sk}| + \rho\Delta_{\max}} \tag{2}$$
$$\Delta_{\min} = \min |Y_{ik} - Y_{sk}|$$
$$\Delta_{\max} = \max |Y_{ik} - Y_{sk}|$$

($i = 1, 2, 3 \cdots m; k = 1, 2, 3 \cdots n; \rho$ 为分辨系数,一般取 $\rho = 0.5$)。

相对于最差参考序列,各评价单元的关联系数计算公式为:

$$\xi_{k(t)}^i = \frac{\Delta'_{\min} + \rho\Delta'_{\max}}{|Y_{ik} - Y_{tk}| + \rho\Delta'_{\max}} \tag{3}$$
$$\Delta'_{\min} = \min |Y_{ik} - Y_{tk}|$$
$$\Delta'_{\max} = \max |Y_{ik} - Y_{tk}|$$

($i = 1, 2, 3 \cdots m; k = 1, 2, 3 \cdots n; \rho$ 为分辨系数,一般取 $\rho = 0.5$)。

2.5.4 计算关联度 相对于最优参考序列,各评价单元的关联度计算公式为:

$$r_{i(s)} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \xi_{k(s)}^i \tag{4}$$

相对于最差参考序列,各评价单元的关联度计算公式为:

$$r_{i(t)} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \xi_{k(t)}^i \tag{5}$$

2.5.5 计算相对关联度 最理想的评价单元应该与最优参考序列 $r_{i(s)}$ 关联程度最大,同时与最差参考序列 $r_{i(t)}$ 的关联程度最小^[28]。因此,定义评价单元序列同时相对于最优和最差参考序列的相对关联度 r_i 为:

$$r_i = \frac{r_{i(s)}}{r_{i(s)} + r_{i(t)}} \quad (i = 1, 2, 3 \cdots m) \tag{6}$$

2.6 滇龙胆药材灰度关联分析

2.6.1 建立样品数据集 采集滇龙胆样品 4 种活性成分含量数据,建立样品数据集,见表 4。

2.6.2 样品数据无量纲化 按公式(1)处理样品的原始数据。

2.6.3 计算关联系数与关联度 按公式(2)~(5)计算各评价单元相对于最优和最差参考序列的关联系数与关联度,结果见表 4,5。

表 4 滇龙胆样品相对于最优参考序列的关联系数与关联度

Table 4 Correlation degrees of Gentianae Radix et Rhizoma samples according to optimal reference sequence

No.	马钱苷酸	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	当药苷	关联度	No.	马钱苷酸	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	当药苷	关联度
NL1	0.383	0.442	0.625	0.367	0.454	CN1	0.420	0.516	0.473	0.362	0.443
NL2	0.572	0.564	0.736	0.386	0.564	CN2	0.513	0.697	0.485	0.347	0.511
NL3	0.483	0.677	0.646	0.363	0.542	CN3	0.344	0.524	0.464	0.351	0.421
NL4	0.517	0.574	0.609	0.403	0.526	CN4	0.396	0.524	0.452	0.368	0.435
NL5	0.450	0.443	0.538	0.339	0.442	CN5	0.459	0.603	0.491	0.414	0.492
DW1	0.423	0.522	0.953	0.405	0.576	KS1	0.376	0.352	0.372	0.345	0.361
DW2	0.429	0.496	0.729	0.386	0.510	KS2	0.400	0.357	0.368	0.349	0.369
DW3	0.496	0.567	1.000	0.369	0.608	KS3	0.584	0.356	0.377	0.347	0.416
DW4	0.371	0.391	0.763	0.367	0.473	KS4	0.485	0.370	0.342	0.337	0.383
DW5	0.452	0.518	0.784	0.391	0.536	KS5	0.487	0.333	0.358	0.336	0.379
DH1	0.506	0.462	0.628	0.367	0.491	KX1	0.466	0.462	0.410	0.344	0.421
DH2	0.653	0.512	0.633	0.417	0.554	KX2	0.466	0.423	0.412	0.346	0.412
DH3	1.000	0.705	0.640	0.390	0.684	KX3	0.480	0.419	0.419	0.344	0.415
DH4	0.463	0.823	0.713	0.357	0.589	KX4	0.489	0.357	0.389	0.348	0.396
DH5	0.516	1.000	0.661	0.397	0.643	KX5	0.410	0.386	0.442	0.347	0.396
DY1	0.410	0.422	0.367	0.757	0.489	QM1	0.355	0.394	0.415	0.365	0.382
DY2	0.446	0.383	0.342	0.481	0.413	QM2	0.468	0.433	0.413	0.368	0.421
DY3	0.413	0.406	0.333	0.461	0.403	QM3	0.387	0.398	0.404	0.368	0.389
DY4	0.384	0.449	0.338	0.509	0.420	QM4	0.421	0.392	0.402	0.365	0.395
DY5	0.426	0.505	0.362	0.703	0.499	QM5	0.475	0.460	0.402	0.375	0.428
CD1	0.668	0.416	0.400	0.738	0.556	QZ1	0.362	0.419	0.396	0.333	0.378
CD2	0.704	0.467	0.425	0.856	0.613	QZ2	0.333	0.412	0.415	0.343	0.376
CD3	0.501	0.408	0.412	0.631	0.488	QZ3	0.450	0.417	0.419	0.349	0.409
CD4	0.807	0.533	0.393	0.730	0.616	QZ4	0.370	0.502	0.412	0.358	0.411
CD5	0.538	0.369	0.402	1.000	0.577	QZ5	0.352	0.403	0.423	0.340	0.379

表 5 滇龙胆样品相对于最差参考序列的关联系数与关联度

Table 5 Correlation degrees of Gentianae Radix et Rhizoma samples according to worst reference sequence

No.	马钱苷酸	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	当药苷	关联度	No.	马钱苷酸	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	当药苷	关联度
NL1	0.720	0.576	0.417	0.785	0.624	CN1	0.618	0.485	0.531	0.808	0.610
NL2	0.444	0.449	0.379	0.709	0.495	CN2	0.488	0.390	0.516	0.891	0.571
NL3	0.518	0.396	0.408	0.804	0.532	CN3	0.915	0.478	0.542	0.868	0.701
NL4	0.484	0.443	0.424	0.659	0.503	CN4	0.677	0.478	0.559	0.778	0.623
NL5	0.562	0.574	0.467	0.956	0.640	CN5	0.549	0.427	0.510	0.632	0.529
DW1	0.611	0.480	0.339	0.652	0.520	KS1	0.745	0.860	0.762	0.910	0.819
DW2	0.600	0.504	0.380	0.710	0.548	KS2	0.665	0.835	0.780	0.879	0.790
DW3	0.504	0.447	0.333	0.776	0.515	KS3	0.437	0.839	0.743	0.892	0.728
DW4	0.766	0.695	0.372	0.782	0.654	KS4	0.516	0.772	0.930	0.967	0.796
DW5	0.559	0.483	0.367	0.694	0.526	KS5	0.513	1.000	0.828	0.977	0.829
DH1	0.494	0.544	0.415	0.783	0.559	KX1	0.539	0.545	0.641	0.913	0.659
DH2	0.405	0.489	0.413	0.624	0.483	KX2	0.540	0.612	0.636	0.900	0.672
DH3	0.333	0.387	0.410	0.696	0.457	KX3	0.522	0.619	0.620	0.918	0.670
DH4	0.544	0.359	0.385	0.832	0.530	KX4	0.512	0.832	0.701	0.886	0.733
DH5	0.485	0.333	0.402	0.677	0.474	KX5	0.641	0.708	0.576	0.897	0.706
DY1	0.640	0.612	0.786	0.373	0.603	QM1	0.847	0.685	0.628	0.795	0.739
DY2	0.569	0.719	0.929	0.521	0.684	QM2	0.537	0.591	0.633	0.778	0.635
DY3	0.635	0.650	1.000	0.546	0.708	QM3	0.707	0.674	0.656	0.777	0.704
DY4	0.717	0.564	0.963	0.491	0.684	QM4	0.614	0.689	0.662	0.793	0.690
DY5	0.605	0.495	0.809	0.388	0.574	QM5	0.528	0.548	0.660	0.749	0.621
CD1	0.399	0.626	0.667	0.378	0.518	QZ1	0.808	0.620	0.678	1.000	0.776
CD2	0.388	0.538	0.608	0.353	0.472	QZ2	1.000	0.635	0.628	0.923	0.797
CD3	0.499	0.645	0.636	0.414	0.549	QZ3	0.563	0.624	0.621	0.882	0.672
CD4	0.362	0.471	0.686	0.380	0.475	QZ4	0.769	0.498	0.637	0.831	0.683
CD5	0.467	0.773	0.661	0.333	0.559	QZ5	0.865	0.658	0.611	0.948	0.770

2.6.4 计算相对关联度 按公式 6 计算滇龙胆样品的相对关联度,并以 r_i 大小进行排序,结果见表 6。

2.6.5 质量评价 相对关联度 r_i 越大,则该样品的评价越高, r_i 排序结果可以作为样品质量优劣评价的依据。由表 6 可见,滇龙胆样品相对关联度在 0.306~0.600,其中 14 个样品相对关联度 >0.500,23 个样品相对关联度 <0.400,表明不同来源滇龙胆之间质量存在较大差异,排序结果对质量评价有较大参考价值。大理鹤庆的 DH3 和 DH5 的 r_i 分别为 0.600 和 0.576,排序位于前两位,质量最优。

计算 10 个地区样品相对关联度 r_i 的平均值及 RSD,见表 7。不同地区样品相对关联度的平均值在 0.325~0.541,证明不同地区滇龙胆质量的总体水平存在差异。大理鹤庆样品(DH1~DH5) r_i 的平均值最大,总体水平最高,可作为优质滇龙胆种源

进一步研究和推广;昆明西山区样品(KS1~KS5) r_i 的平均值最小,总体水平最低。不同地区样品相对关联度的 RSD 在 4.4%~11.9%,昆明寻甸样品(KX1~KX5) r_i 的 RSD 最小,怒江兰坪样品(NL1~NL5) r_i 的 RSD 最大,结果显示相对其他地区,寻甸样品最为稳定,兰坪样品稳定性最差。

3 讨论

本研究对不同提取时间(30,40 min)及不同体积分数甲醇(40%,60%,80%)进行考察。结果表明,当提取时间为 40 min,80% 甲醇,图谱信息较为丰富。分别考察 232,241,258,275 nm 波长处的指纹图谱。结果显示,在 241 nm 波长处,色谱峰数量较多、分离效果好,龙胆苦苷等主要成分的特征峰明显。

中药有效成分较多,是一个复杂的化学体系,多个指标成分评价标准不统一,评价较为困难。GRA

表 6 滇龙胆样品相对关联度排序

Table 6 Sequence of relative correlation degrees of Gentianae Radix et Rhizoma samples

No.	相对关联度	排序	No.	相对关联度	排序
NL1	0.421	22	CN1	0.420	23
NL2	0.533	7	CN2	0.472	17
NL3	0.505	14	CN3	0.375	35
NL4	0.511	11	CN4	0.411	25
NL5	0.409	26	CN5	0.482	16
DW1	0.525	9	KS1	0.306	50
DW2	0.482	15	KS2	0.318	48
DW3	0.541	5	KS3	0.364	38
DW4	0.420	24	KS4	0.325	46
DW5	0.505	13	KS5	0.313	49
DH1	0.468	19	KX1	0.389	29
DH2	0.534	6	KX2	0.380	32
DH3	0.600	1	KX3	0.383	30
DH4	0.526	8	KX4	0.351	42
DH5	0.576	2	KX5	0.360	40
DY1	0.448	21	QM1	0.341	43
DY2	0.376	34	QM2	0.399	28
DY3	0.363	39	QM3	0.356	41
DY4	0.380	31	QM4	0.364	37
DY5	0.465	20	QM5	0.408	27
CD1	0.518	10	QZ1	0.327	45
CD2	0.565	3	QZ2	0.321	47
CD3	0.471	18	QZ3	0.378	33
CD4	0.565	4	QZ4	0.375	36
CD5	0.508	12	QZ5	0.330	44

表 7 10 个地区样品相对关联度的平均值及 RSD

Table 7 Average value and RSD of relative correlation degrees of samples in 10 origins

样品编号	平均相对关联度	RSD/%
NL1 ~ NL5	0.476	11.9
DW1 ~ DW5	0.495	9.6
DH1 ~ DH5	0.541	9.4
DY1 ~ DY5	0.406	11.4
CD1 ~ CD5	0.525	7.7
CN1 ~ CN5	0.432	10.3
KS1 ~ KS5	0.325	6.9
KX1 ~ KX5	0.372	4.4
QM1 ~ QM5	0.374	7.7
QZ1 ~ QZ5	0.346	8.1

法以中药为灰色系统,综合各评价指标,用相对关联度作为测度,可用于中药质量评价。

本研究测定云南 10 个不同地区滇龙胆根及根茎中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药苷的

含量,采用 GRA 法处理样品 4 种指标成分含量数据,计算各评价单元序列相对于参考序列的相对关联度作为测度,对样品质量进行排序,实现滇龙胆的合理评价。实验结果表明,DH3 和 DH5 的质量最优,可作为优质种源进行深入研究;鹤庆样品质量的总体水平最高、稳定性较好,鹤庆可作为适宜地开展滇龙胆试点栽培及选育研究。

受不同产地的温度、降水等复杂环境因素影响^[31],滇龙胆中主要活性成分含量及构成比例变化明显^[32],对多个指标成分进行逐一分析的评价方法较为复杂。GRA 法结合多指标成分定量的评价方法简单、全面,保证了滇龙胆质量的稳定、有效,为资源的合理开发利用及优质种源的筛选提供了参考依据。

[参考文献]

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 62 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 100.

[2] 沈连生. 神农本草经中药彩色图谱[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 54.

[3] PAN Y, ZHAO Y L, ZHANG J, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) [J]. Chem Biodivers, 2016, 13(2): 107-150.

[4] PAN Y,ZHANG J, ZHAO Y L, et al. Investigation of metabolites accumulation in medical plant *Gentiana rigescens* during different growing stage using LC-MS/MS and FT-IR[J]. Bot Stud, 2015, 56(1): 1-9.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 96.

[6] JIA N, CHU W, LI Y, et al. Iridoid glycosides from the flowers of *Gentiana macrophylla* Pall. ameliorate collagen-induced arthritis in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189: 1-9.

[7] Wani B A, Ramamoorthy D, Rather M A, et al. Induction of apoptosis in human pancreatic MiaPaCa-2 cells through the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) by *Gentiana kurroo* root extract and LC-ESI-MS analysis of its principal constituents [J]. Phytomedicine, 2013, 20(8): 723-733.

[8] Olennikov D N, Kashchenko N I, Chirikova N K, et al. Iridoids and flavonoids of four siberian gentians: chemical profile and gastric stimulatory effect [J]. Molecules, 2015, 20(10): 19172-19188.

[9] WEI S, Chi H, Kodama H, et al. Anti-inflammatory effect of three iridoids in human neutrophils [J]. Nat Prod Res, 2013, 27(10): 911-915.

[10] HUANG X J, LI J, MEI Z Y, et al. Gentiopicroside

and sweroside from *Veratrilla baillonii* Franch. induce phosphorylation of Akt and suppress Pck1 expression in hepatoma cells[J]. *Biochem Cell Biol*, 2016, 94(3): 270-278.

[11] Saravanan S, Islam V I H, Thirugnanasambantham K, et al. Swertiamarin ameliorates inflammation and osteoclastogenesis intermediates in IL-1 β induced rat fibroblast-like synoviocytes[J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(6): 451-462.

[12] TIAN C, ZHANG T, WANG L, et al. The hepatoprotective effect and chemical constituents of total iridoids and xanthones extracted from *Swertia mussotii* Franch [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(1): 259-266.

[13] PAN Y, ZHANG J, SHEN T, et al. Optimization of ultrasonic extraction by response surface methodology combined with ultrafast liquid chromatography-ultraviolet method for determination of four iridoids in *Gentiana rigescens* [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(3): 529-537.

[14] 沈涛, 李远菊, 张霁, 等. 林药复合栽培滇龙胆 HPLC 指纹图谱计量特征与质量评价[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(7): 579-585.

[15] PAN Y, ZHANG J, SHEN T, et al. Investigation of chemical diversity in different parts and origins of ethnomedicine *Gentiana rigescens* Franch using targeted metabolite profiling and multivariate statistical analysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(2): 232-240.

[16] PAN Y, ZHANG J, SHEN T, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry combined with fourier transform mid-infrared spectroscopy and chemometrics for comparative analysis of raw and processed *Gentiana rigescens* [J]. *Technologies J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2015, 38(14): 1407-1416.

[17] 邓聚龙. 灰理论基础[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2002: 122.

[18] 魏航, 林励, 张元, 等. 灰色系统理论在中药色谱指纹图谱模式识别中的应用研究[J]. *色谱*, 2013, 31(2): 127-132.

[19] 胡凡. 企业融资风险的灰关联度评价[J]. *统计与决策*, 2016(10): 176-179.

[20] Kuo C F J, Syu S S, LIN C H, et al. The application of principal component analysis and gray relational method in the optimization of the melt spinning process using the cooling air system[J]. *Text Res J*, 2013, 83(4): 371-380.

[21] JIN X, XU X, SONG X, et al. Estimation of leaf water content in winter wheat using grey relational analysis-partial least squares modeling with hyperspectral data [J]. *Agron J*, 2013, 105(5): 1385-1392.

[22] WEI G W. Gray relational analysis method for intuitionistic fuzzy multiple attribute decision making [J]. *Expert Syst Appl*, 2011, 38(9): 11671-11677.

[23] ZHANG X, JIN F, LIU P. A grey relational projection method for multi-attribute decision making based on intuitionistic trapezoidal fuzzy number [J]. *Appl Math Model*, 2013, 37(5): 3467-3477.

[24] WU X D, CHEN H G, ZHOU X, et al. Studies on chromatographic fingerprint and fingerprinting profile-efficacy relationship of *Saxifraga stolonifera* Meerb [J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 22781-22798.

[25] 谌松霖, 张利红, 陈聪, 等. 基于灰色理论联合多元统计方法的中药研究模式的探讨[J]. *中草药*, 2016, 47(1): 1-5.

[26] 李成义, 刘书斌, 李硕, 等. 甘肃商品白条党参质量的灰色关联度评价[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(21): 33-39.

[27] 李硕, 王文全, 侯俊玲, 等. 基于灰色关联度法评价商品防风药材质量[J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(4): 247-252.

[28] WANG S, HUA Y, XU L, et al. Quality evaluation of *Scrophulariae Radix* processed by different ‘sweating’ methods based on simultaneous determination of multiple bioactive constituents combined with grey relational analysis [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 850.

[29] WANG J, TONG X, LI P, et al. Bioactive components on immuno-enhancement effects in the traditional Chinese medicine Shenqi Fuzheng injection based on relevance analysis between chemical HPLC fingerprints and *in vivo* biological effects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 405-415.

[30] LIU H, ZHENG Y, LI C, et al. Discovery of anti-inflammatory ingredients in Chinese Herbal Formula Kouyanqing granule based on relevance analysis between chemical characters and biological effects [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 180180.

[31] 沈涛, 杨美权, 赵振玲, 等. 滇龙胆中萜类物质积累的动态变化[J]. *植物学报*, 2011, 46(6): 652-657.

[32] 沈涛, 黄衡宇, 张霁, 等. 滇龙胆与青叶胆环烯醚萜类物质计量特征分析[J]. *植物分类与资源学报*, 2015, 37(1): 105-112.

[责任编辑 顾雪竹]