

指纹图谱结合灰色关联度分析法对不同产地赤芍质量的评价研究

付士朋¹, 沈宏伟⁴, 王谦博², 李俊萍¹, 王 聪¹, 郭盛磊^{1,3}, 王振月^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 广东药科大学附属第一医院 药学部, 广东 广州 510000

3. 黑龙江珍宝岛药业博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150040

4. 江阴天江药业有限公司, 江苏 江阴 214400

摘要: 目的 研究不同产地赤芍的指纹图谱, 测定其中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷的含量并对其进行系统聚类, 应用灰色关联度分析产地与含量的关系, 为赤芍的质量评价提供参考。方法 采用高效液相色谱法构建 21 个不同产地赤芍药材指纹图谱, 并利用主成分分析及系统聚类分析对测定结果进行分类, 灰色关联度法处理各指标性成分, 计算其相对关联度。结果 建立了 21 个产地赤芍的 HPLC 指纹图谱, 标定 11 个共有峰, 指认其中 5 个(没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷)共有峰, 北赤芍相似度均大于 0.9, 川赤芍相似度均小于 0.9, 主成分分析结合聚类分析将其分为二类, 灰色关联度分析结果显示相对关联度(r_i)最大的为甘肃陇南, 其次为四川甘孜。结论 不同产地赤芍具有较大差异, 通过建立指纹图谱, 主成分结合系统聚类分析和灰色关联度分析方法对 21 个产地赤芍综合评价, 为赤芍质量评价提供科学依据。

关键词: 赤芍; 指纹图谱; 系统聚类分析; 灰色关联度分析; 没食子酸; 芍药内酯苷; 芍药苷; 苯甲酸; 苯甲酰芍药苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)23-5865-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.030

Study on fingerprint and gray correlation analysis of *Paeoniae Radix Rubra* from different habitats

FU Shi-peng¹, SHEN Hong-wei⁴, WANG Qian-bo², LI Jun-ping¹, WANG Cong¹, GUO Sheng-lei^{1,3}, WANG Zhen-yue¹

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China

3. Postdoctoral Programme of Heilongjiang Zbd Pharmaceutical Co., Ltd., Harbin 150040, China

4. Jiangyin Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangyin 214400, China

Abstract: Objective To study the fingerprints of *Paeoniae Radix Rubra* in different habitats, and determine the content of five chemical components (gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, benzoic acid, and benzoyl paeoniflorin) and systematically cluster them. The relationship between origin and content was analyzed by grey correlation degree to provide reference for the quality evaluation of *Paeoniae Radix Rubra*. **Methods** Fingerprints of *Paeoniae Radix Rubra* from 21 different producing areas were constructed by high performance liquid chromatography. The results were classified by principal component analysis and systematic cluster analysis. The gray correlation degree method was used to process the index components and their relative correlations were calculated. **Results** HPLC fingerprints of *Paeoniae Radix Rubra* from 21 habitats were established, 11 common peaks were confirmed, and five of them (gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, benzoic acid, and benzoyl paeoniflorin) were identified. The similarity of *Paeonia lactiflora* was greater than 0.9, and the similarity of *Paeonia veitchii* was less than 0.9. It was divided into two categories by principal component analysis combined with cluster analysis. The results of grey correlation analysis showed that the relative correlation (r_i) was the largest in Gansu, followed by Ganzhi in Sichuan. **Conclusion** There is a big difference in the relative yield of *Paeoniae Radix Rubra* in different habitats. This experiment provides a scientific basis for the quality evaluation of *Paeoniae Radix Rubra* by fingerprint analysis, principal component analysis combined system cluster analysis and grey correlation analysis method.

Key words: *Paeoniae Radix Rubra*; fingerprint; systematic cluster analysis; grey correlation analysis; gallic acid; albiflorin; paeoniflorin; benzoic acid; benzoyl paeoniflorin

收稿日期: 2019-03-06

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划(2016YFC0500303)——东北森林区道地林药资源生态开发利用技术与示范黑龙江省国家科技重大专项和重点研发项目省级资助(GX17C006); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z17208)

作者简介: 付士朋(1991—), 男, 硕士研究生, 从事赤芍质量标准研究。Tel: 18846432340 E-mail: 1196683291@qq.com

*通信作者 王振月, 教授, 博士生导师, 从事中药资源研究。Tel: (0451)87266873 E-mail: wangzhen_yue@163.com

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. vitchii* Lynch. 的干燥根^[1], 始载于《神农本草经》, 列为中品, 具有活血化瘀、清热凉血的功效。其主要生理活性成分包括酚酸类、单萜苷类及苯肽类成分^[2-3]。现代药理研究表明赤芍具有调节免疫、解痉挛、抗炎、抗惊厥、改善心肺功能、抑制癌细胞增殖的作用^[4-5]。因其基原不同, 分为北赤芍与川赤芍, 北赤芍主要分布在内蒙、东北、河北等地, 川赤芍主要分布在四川、甘肃、青海等地, 目前均在市场流通使用。

指纹图谱技术具有综合、宏观、模糊等非线性特点, 被认为是鉴别中药真实性及评价质量一致性和产品稳定性实际可行的模式方法^[6], 目前对赤芍指纹图谱研究较多, 王巧等^[7]通过对白芍与赤芍的指纹图谱研究, 建立白芍与赤芍质量控制方法; 孙冬梅等^[8]通过指纹图谱分别对北赤芍和川赤芍标定共有峰, 结果显示 2 个基原化学成分存在较大差别, 并测得指认峰面积含量。灰色关联分析主要研究系统模型不明确、运行机制不清楚及行为信息不完全系统的建模等问题, 该方法主要用于经济评估、材料优化设计等方面, 近几年在中药研究中的应用也有报道^[9-10], 研究证明该方法对研究中药质量有较好的效果。本研究采用指纹图谱、主成分分析系统聚类分析与灰色关联度 (GPA) 综合评价不同产地赤芍药材的质量分类, 多角度分析, 为赤芍药材质量标准研究提供可参考方法。

1 材料与仪器

采集 21 个不同产地的赤芍样品, 经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定分别为毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根与毛茛科川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch. 的干燥根, 信息见表 1。

H1650 台式高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); B-260 恒温水浴锅 (上海亚荣生化仪器有限公司); METTLER AE240 十万分之一电子天平 (梅特勒-托利多国际贸易有限公司); 科盟牌超声波清洗机 (广州市科洁盟实验仪器有限公司); Wasters e2695 高效液相色谱仪, 色谱柱为 Thermo C₁₈ 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 预柱 Phenomenex ODS-C₁₈ (4.0 mm×3.0 mm), HPLC 流动相乙腈为色谱纯 (北京百灵威科技有限公司, L510S136), 水为娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司), 对照品没食子酸 (批号 Y19M8C36143)、芍药内酯苷 (批号 Y25F8H30152)、芍药苷 (批号

表 1 赤芍样品信息

Table 1 Sample information of *Paeoniae Radix Rubra*

编号	来源	产地	采集时间
S1	芍药	黑龙江拜泉县	2018-08-03
S2	芍药	黑龙江甘南县	2018-09-12
S3	芍药	大兴安岭野生 1	2017-10-23
S4	芍药	大兴安岭野生 2	2018-08-24
S5	芍药	吉林市	2018-09-19
S6	芍药	黑龙江宁安	2018-08-10
S7	芍药	安徽亳州	2018-10-19
S8	芍药	内蒙古赤峰	2018-09-06
S9	芍药	内蒙古鄂伦春旗大杨树镇	2018-10-21
S10	芍药	黑龙江七台河	2018-09-15
S11	芍药	黑龙江海林	2018-09-10
S12	芍药	山东聊城	2018-10-19
S13	芍药	河北邯郸	2018-10-21
S14	芍药	河北保定	2018-09-13
S15	川赤芍	四川九龙县	2018-11-14
S16	川赤芍	四川阿贝州	2018-11-08
S17	川赤芍	四川省雅安市天全县	2018-11-11
S18	川赤芍	四川甘孜	2018-10-25
S19	川赤芍	甘肃陇南 1	2018-09-04
S20	川赤芍	甘肃陇南 2	2018-09-09
S21	川赤芍	甘肃岷县	2018-11-19

X12A8C33672)、苯甲酸 (批号 Z18S7H21155)、苯甲酰芍药苷 (批号 P02D7F26004), 质量分数均大于 98%, 均购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo C₁₈ 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈为流动相 A, 0.1%磷酸水溶液为流动相 B, 梯度洗脱条件 0~8 min, 5~9%A; 8~20 min, 9~10%A; 20~24 min, 10~13%A; 24~28 min, 13%A; 28~38 min, 13~16%A; 38~48 min, 16~23%A; 48~52 min, 23~30%A; 52~70 min, 30~70%A; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 230 nm; 柱温 35 °C; 理论塔板数按被测物峰计算不低于 3 000。对照品及样品色谱峰见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷适量, 加入甲醇溶解并

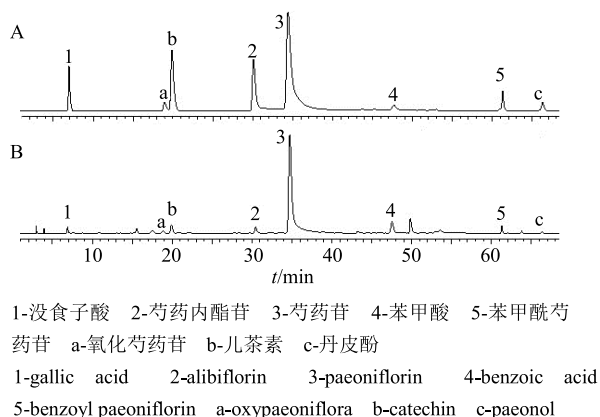


图 1 对照品 (A) 和赤芍样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of control (A) and *Paeoniae Radix Rubra* sample (B)

定容,制成质量浓度为 0.25、0.51、8.01、0.31、0.38、0.11 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

赤芍药材粉碎,过 40 目筛,精确称取赤芍粉末 1 g,置于 50 mL 具塞锥形瓶,精密加入 80%甲醇 10 mL,称定质量,超声提取 45 min,再次称定质量,用 80%甲醇补足失重后将提取液 4 000 r/min 离心 3 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密量取“2.2”项下混合对照品溶液将原液与甲醇按 1:1、1:4、1:9、1:14、1:19 稀释,按“2.1”项下色谱条件进行测定。以对照品的质量浓度为横坐标 (X),以峰面积为纵坐标 (Y),测得回归方程和线性范围。结果没食子酸 $Y=6 \times 10^7 X - 288\ 588$, $r^2=0.999\ 2$,线性范围 0.012 5~0.25 mg/mL; 芍药内酯苷 $Y=4 \times 10^7 X - 46\ 145$, $r^2=0.999\ 7$,线性范围 0.025 5~0.51 mg/mL; 芍药苷 $Y=1 \times 10^7 X + 8 \times 10^6$, $r^2=0.999\ 2$,线性范围 0.16~8 mg/mL; 苯甲酸 $Y=6 \times 10^7 X - 739\ 164$, $r^2=0.999\ 4$,线性范围 0.015~0.3 mg/mL; 苯甲酰芍药苷 $Y=1 \times 10^7 X + 622\ 465$, $r^2=0.999\ 8$,线性范围 0.019~0.38 mg/mL。

2.4.2 精密度试验 取“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次进行测定。结果,没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷的峰面积 RSD 分别为 0.63%、0.38%、0.54%、0.83%、0.97%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进行测定,在室温下分别于

0、2、4、8、12 h 进样,每次进样 10 μL。没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷的峰面积 RSD 分别为 0.53%、0.72%、0.64%、0.77%、0.76%,表明供试品溶液在室温下 12 h 内基本稳定。

2.4.4 重复性试验 取赤芍粉末样品 2 g/份,6 份,按“2.3”项下方法进行制备,按“2.1”项下色谱条件不间断进样测定。结果,没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷的峰面积 RSD 分别为 1.13%、1.22%、1.34%、1.28%、1.34%,表明本方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已测定的赤芍粉末 9 份,每份 1 g,分别按已知含量的 50%、100%、150%加入对照品,按“2.3”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件下测定,每份溶液测定 3 次,计算回收率。没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷平均加样回收率分别为 101.2%、99.8%、99.6%、99.7%、100.9%,RSD 分别为 0.99%、0.93%、1.24%、0.97%、0.94%。

2.5 指纹图谱的建立与相似度分析

2.5.1 指纹图谱建立 按“2.3”项下方法制备供试品,按“2.1”项下色谱条件依次进样,记录色谱峰,将赤芍测得的 21 个产地的指纹图谱以 AIA 格式导入国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012) 软件。以 8 号峰 (保留时间居中,分离度较好,不受其他峰干扰),S1 号样品的指纹图谱为参照谱,采用平均数法,多点矫正色谱峰匹配,确定共有峰 11 个,见图 2。

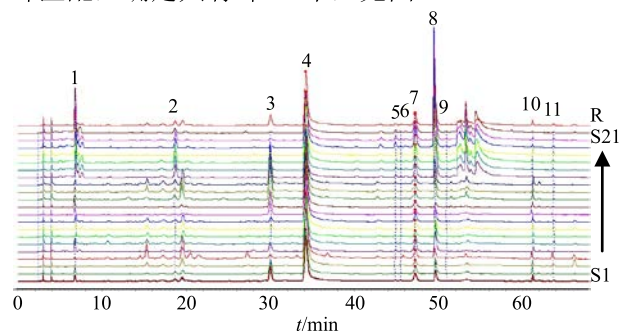


图 2 赤芍药材指纹图谱及对照指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint and comparison fingerprint of *Paeoniae Radix Rubra*

2.5.2 相似度分析 采用对照品对比的方式,指认了其中 5 个共有峰,分别为没食子酸 (1 号峰)、芍药内酯苷 (3 号峰)、芍药苷 (4 号峰)、苯甲酸 (7 号峰)、苯甲酰芍药苷 (8 号峰),中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012) 软件对 21 批样品指纹

图谱相似度计算发现 S1~S14 和 S18 相似度均大于 0.90, 可归为一类; S15、S16、S17、S19、S20、S21 相似度小于 0.90, 可归为一类。由图 2 可以看出川赤芍成分较北赤芍成分复杂一些。指纹图谱相似度见表 2。

表 2 不同产地赤芍相似度

Table 2 Similarity of *Paeoniae Radix Rubra* from different habitats

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.953	S12	0.911
S2	0.959	S13	0.904
S3	0.933	S14	0.915
S4	0.930	S15	0.872
S5	0.971	S16	0.857
S6	0.959	S17	0.865
S7	0.958	S18	0.957
S8	0.949	S19	0.866
S9	0.949	S20	0.874
S10	0.954	S21	0.854
S11	0.933		

2.6 不同产地 5 种成分含量测定与分析

不同产地 5 种成分质量分数见表 3, 在 S12 中没食子酸质量分数最高为 0.232%, 约为含量最低的 17 倍; 芍药内酯苷最高与最低相差近 20 倍, 分别为 S11 与 S7; 芍药苷含量则是 S4 产地最高为 6.27%, 远超过国家药典标准 ($>1.8\%$); 苯甲酸含量各产地差别不大; 苯甲芍药苷含量最高与最低则相差近 2 倍。

2.6.1 主成分分析 (PCA) 探讨赤芍中成分与产地之间的关系, 利用 SPSS 20.0 对不同产地的 5 种成分含量进行 PCA, 经过标准化处理后, 样本数据得到 5 个成分特征值依次为 2.425、1.183、0.924、0.336、0.132, 结果见表 4。由 PCA 结果可知, 前 3 个累积方差贡献率达到 90.646%, 说明这 3 个主成分基本代表了全部指标信息, 取前 3 个特征值, 并计算相应的特征向量。

表 3 赤芍含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Content determination of *Paeoniae Radix Rubra* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	质量分数/%				
	没食子酸	芍药内酯苷	芍药苷	苯甲酸	苯甲酰芍药苷
S1	0.033 $\pm$ 0.006	0.209 $\pm$ 0.027	3.030 $\pm$ 0.087	0.100 $\pm$ 0.004	0.133 $\pm$ 0.006
S2	0.031 $\pm$ 0.012	0.170 $\pm$ 0.034	2.882 $\pm$ 0.076	0.126 $\pm$ 0.007	0.100 $\pm$ 0.007
S3	0.013 $\pm$ 0.008	0.034 $\pm$ 0.024	4.940 $\pm$ 0.082	0.092 $\pm$ 0.006	0.102 $\pm$ 0.005
S4	0.014 $\pm$ 0.014	0.079 $\pm$ 0.046	6.274 $\pm$ 0.152	0.122 $\pm$ 0.006	0.123 $\pm$ 0.005
S5	0.050 $\pm$ 0.025	0.134 $\pm$ 0.036	2.747 $\pm$ 0.035	0.139 $\pm$ 0.011	0.078 $\pm$ 0.011
S6	0.028 $\pm$ 0.031	0.012 $\pm$ 0.046	3.520 $\pm$ 0.042	0.088 $\pm$ 0.003	0.046 $\pm$ 0.013
S7	0.022 $\pm$ 0.005	0.011 $\pm$ 0.053	2.690 $\pm$ 0.033	0.074 $\pm$ 0.012	0.039 $\pm$ 0.008
S8	0.039 $\pm$ 0.014	0.090 $\pm$ 0.034	5.553 $\pm$ 0.042	0.137 $\pm$ 0.007	0.136 $\pm$ 0.004
S9	0.037 $\pm$ 0.028	0.074 $\pm$ 0.021	5.872 $\pm$ 0.065	0.117 $\pm$ 0.008	0.095 $\pm$ 0.006
S10	0.042 $\pm$ 0.021	0.222 $\pm$ 0.051	3.376 $\pm$ 0.046	0.071 $\pm$ 0.013	0.062 $\pm$ 0.014
S11	0.047 $\pm$ 0.016	0.230 $\pm$ 0.034	3.409 $\pm$ 0.037	0.084 $\pm$ 0.012	0.087 $\pm$ 0.009
S12	0.030 $\pm$ 0.031	0.183 $\pm$ 0.018	3.863 $\pm$ 0.077	0.105 $\pm$ 0.014	0.197 $\pm$ 0.011
S13	0.028 $\pm$ 0.009	0.182 $\pm$ 0.026	3.660 $\pm$ 0.034	0.098 $\pm$ 0.007	0.188 $\pm$ 0.016
S14	0.030 $\pm$ 0.013	0.161 $\pm$ 0.006	4.040 $\pm$ 0.068	0.109 $\pm$ 0.019	0.171 $\pm$ 0.003
S15	0.168 $\pm$ 0.022	0.020 $\pm$ 0.021	3.161 $\pm$ 0.042	0.152 $\pm$ 0.006	0.074 $\pm$ 0.019
S16	0.178 $\pm$ 0.016	0.019 $\pm$ 0.019	2.992 $\pm$ 0.035	0.151 $\pm$ 0.011	0.084 $\pm$ 0.011
S17	0.181 $\pm$ 0.021	0.025 $\pm$ 0.017	2.284 $\pm$ 0.055	0.203 $\pm$ 0.007	0.094 $\pm$ 0.006
S18	0.029 $\pm$ 0.015	0.049 $\pm$ 0.021	4.204 $\pm$ 0.044	0.224 $\pm$ 0.006	0.178 $\pm$ 0.005
S19	0.210 $\pm$ 0.007	0.042 $\pm$ 0.013	4.232 $\pm$ 0.037	0.229 $\pm$ 0.017	0.072 $\pm$ 0.017
S20	0.186 $\pm$ 0.031	0.033 $\pm$ 0.025	4.120 $\pm$ 0.028	0.203 $\pm$ 0.005	0.067 $\pm$ 0.006
S21	0.232 $\pm$ 0.018	0.026 $\pm$ 0.014	2.886 $\pm$ 0.073	0.227 $\pm$ 0.008	0.075 $\pm$ 0.009

表 4 主成分变量解释

Table 4 Explanation of principal component variables

主成分	初始特征值			被提取的载荷平方和		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	2.425	48.501	48.501	2.425	48.501	48.501
2	1.183	23.668	72.169	1.183	23.668	72.169
3	0.924	18.477	90.646	0.924	18.477	90.646*
4	0.336	6.724	97.369			
5	0.132	2.631	100.000			

*主成分 1、2、3 累积贡献率达到 90.646% > 90%，可认为这 3 个主成分基本包含全部指标信息

“*” cumulative contribution rate of principal components 1, 2, and 3 reaches 90.646% > 90%, and it can be considered that these three principal components basically contain all indicator information.

3 个主成分为 $F_1 = 0.909 \times \text{没食子酸} - 0.753 \times \text{芍药内酯苷} - 0.323 \times \text{芍药苷} + 0.782 \times \text{苯甲酸} - 0.564 \times \text{苯甲酰芍药苷}$; $F_2 = 0.000 \times \text{没食子酸} - 0.285 \times \text{芍药内酯苷} + 0.800 \times \text{芍药苷} + 0.433 \times \text{苯甲酸} + 0.525 \times \text{苯甲酰芍药苷}$; $F_3 = 0.249 \times \text{没食子酸} + 0.441 \times \text{芍药内酯苷} - 0.430 \times \text{芍药苷} + 0.378 \times \text{苯甲酸} + 0.583 \times \text{苯甲酰芍药苷}$ 。因而评价因子 (F) 的计算公式为 $F = F_1 \times 0.485 + F_2 \times 0.237 + F_3 \times 0.185$ 。

2.6.2 系统聚类分析 计算所有产地的 F , 经 SPSS 20.0 软件采用平方欧氏距离法进行系统聚类分析, 通过图 3 可以看出, 将各成分分为 2 类。S15~S17、S19~S21 归为一类, 其来源为川赤芍。S1~S14 与 S18 归为一类, S1~S14 其来源为北赤芍, 结果与指纹图谱相吻合。

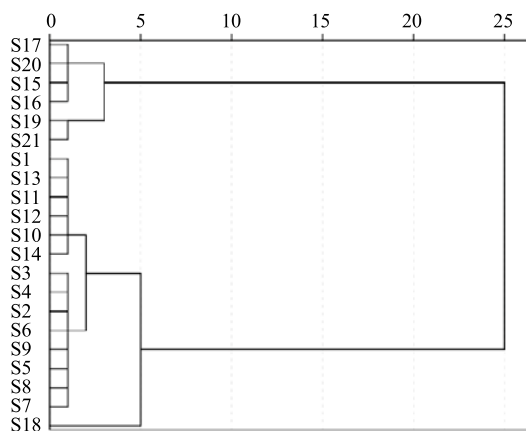


图 3 系统聚类分析

Fig. 3 Systematic cluster analysis

2.7 GRA 分析

2.7.1 无量纲化处理 在 GRA 分析中, 要确定评价单元序列, 评价单元序列由样品类型和评价指标组成, 设评价单元序列由 m 个样品和 n 个评价指标序列, 组成评价单元序列为 $\{X_{ik}\}$ ($i=1, 2, 3, \dots, m; k=1, 2, 3, \dots, n$)。在多指标评价时因各指标单位、量级不同, 无法进行直接评, 所以按均值化

法对原始数据进行无量纲化处理, 计算公式如下。

$$Y_{ik} = X_{ik} / X_k$$

Y_{ik} 为处理后数据, X_{ik} 为原始数据, X_k 为 m 个样品第 k 个指标的均值

2.7.2 参考序列选择与计算 确定好评价单元后, 要选择参考序列, 参考序列包括最优参考序列 (所有样品中每一评价指标最大值) 和最差参考序列 (所有样品中每一评价指标最小值), 最优参考序列为 $\{X_{sk}\}$ ($k=1, 2, 3, \dots, n$), 是 m 个样品对应指标中的最大值; 最差参考序列为 $\{X_{ck}\}$ ($k=1, 2, 3, \dots, n$), 是 m 个样品对应指标中的最小值。最优参考序列关联系数的公式如下。

$$\xi_{k(s)}^i = \frac{\Delta_{\min} + \rho \Delta_{\max}}{|Y_{ik} - Y_{sk}| + \rho \Delta_{\max}} \quad (1)$$

$\Delta_{\min} = \min |Y_{ik} - Y_{sk}|$, $\Delta_{\max} = \max |Y_{ik} - Y_{sk}|$, Y_{sk} 为各个成分对应的 Y_{ik} 的最大值, ρ 为分辨系数, 通常取值为 0.5。

最差参考序列关联系数的计算公式如下。

$$\xi_{k(s)}^i = \frac{\Delta'_{\min} + \rho \Delta'_{\max}}{|Y_{ik} - Y_{sk}| + \rho \Delta'_{\max}} \quad (2)$$

$\Delta'_{\min} = \min |Y_{ik} - Y_{sk}|$, $\Delta'_{\max} = \max |Y_{ik} - Y_{sk}|$, Y_{sk} 为各个成分对应的 Y_{ik} 的最小值, ρ 为分辨系数, 通常取值为 0.5

最优关联度计算公式见公式 (3), 最差关联度计算见公式 (4), 相对关联度 (r_i) 计算公式见公式 (5), 按公式计算各样品 r_i , 排序结果见表 5。

$$r_{i(s)} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \xi_{k(s)}^i \quad (3)$$

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

$$r_i = \frac{r_{i(s)}}{r_{i(s)} + r_{i(t)}} \quad (5)$$

r_i 越大, 样品评价越高, 表 5 结果表明不同地区赤芍存在差异性, 且差异性明显, 在 21 个产地中相对关联度 > 0.5 的有 4 个产地, 其中相对关联度最高的为 S19, 其次为 S18、S21。综合表中信息

表 5 不同产地赤芍 5 种成分相对关联度

Table 5 Relative correlation of five components of *Paeoniae Radix Rubra* from different habitats

编号	没食子酸/%	芍药内酯苷/%	芍药苷/%	苯甲酸/%	苯甲酰芍药苷/%	r_i	排序
S1	0.426	1.392	0.798	0.737	1.247	0.446	11
S2	0.400	1.132	0.759	0.928	0.938	0.414	15
S3	0.168	0.226	1.301	0.678	0.956	0.369	19
S4	0.181	0.526	1.652	0.899	1.153	0.471	9
S5	0.645	0.892	0.723	1.024	0.731	0.398	18
S6	0.361	0.080	0.927	0.648	0.431	0.299	20
S7	0.284	0.073	0.708	0.545	0.366	0.265	21
S8	0.503	0.599	1.463	1.009	1.275	0.481	7
S9	0.477	0.493	1.547	0.862	0.891	0.448	10
S10	0.542	1.479	0.889	0.523	0.581	0.404	17
S11	0.606	1.532	0.898	0.619	0.816	0.443	12
S12	0.387	3.950	1.017	0.773	1.847	0.504	4
S13	0.361	3.144	0.964	0.722	1.763	0.482	6
S14	0.387	4.056	1.064	0.803	1.969	0.474	8
S15	2.167	0.133	0.833	1.120	0.694	0.413	16
S16	2.296	0.127	0.788	1.112	0.788	0.418	14
S17	2.335	0.167	0.602	1.495	0.881	0.440	13
S18	0.374	0.326	1.107	1.650	1.669	0.512	2
S19	2.709	0.280	1.115	1.687	0.675	0.535	1
S20	2.399	0.220	1.085	1.495	0.628	0.484	5
S21	2.993	0.173	0.760	1.672	0.703	0.507	3

川赤芍关联度高于北赤芍，但总体质量不稳定，S15、S16、S17 相对关联度为 0.413、0.418、0.440，排序分别在 16、14、13。

3 讨论

赤芍因基原不同分为北赤芍和川赤芍，但在临床上作为同一药材使用，为探讨两者区别，本实验对 21 批不同产地赤芍进行指纹图谱标定。指纹图谱确定 11 个共有峰，并指认其中 5 个色谱峰，分别为没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸及苯甲酰芍药苷。依据相似度可大致归为 2 类，相似度 >0.9 为北赤芍，相似度 <0.9 为川赤芍。化学成分对比发现在 5~10 min 和 50~60 min 内北赤芍中化学成分少、含量低，而川赤芍中化学成分多、含量高；在 12~18 min 内北赤芍成分及含量多于川赤芍，结果与向楚兵等^[11]研究结果一致，推测可能受气候、土壤、光照等综合因素的影响。S19 产地为四川甘孜，但其相似度为 0.957，与北赤芍更相近，考虑四川等地是否也存在北赤芍的引种与种植。

含量测定时发现四川地区赤芍药材中氧化芍药苷与其他峰难以分离，出峰时间一致，但氧化芍药苷最大吸光度为 257.2 nm，而在四川等地测定相同时间出峰的吸光度则为 370 nm，确定不是同一物质，氧化芍药苷峰面积前移，或者两峰重叠，实验中多次用不同方法对色谱条件进行改善，依然无法分离，考虑可能是紫外检测灯或色谱柱分离能力低导致结果。同时前期对丹皮酚也进行了测定，除 S10、S11 产地没有检测到丹皮酚外，其他产地均含有丹皮酚，以 S4（大兴安岭野生 2）丹皮酚含量为 0.05% 最高，其他产地质量分数在 0.003%~0.05%。21 产地测得芍药苷含量均符合《中国药典》2015 年版，质量分数最大是 S4（6.274%，大兴安岭野生赤芍 2），其次为 S9（5.875%，内蒙鄂伦春旗），四川等地均 $<5\%$ ，系统聚类分析法将赤芍按成分分为 2 类，这与指纹图谱结果相一致。

本实验对 5 种化学成分与不同产地的关系进行灰色关联度分析，结果 S19（甘肃陇南 1）最优，

关联度为 0.535, 其次为 S18 (四川甘孜) 关联度为 0.512, 结合含量测定分析, 2 个产地芍药苷含量均为 4.2%, 低于 S4 (大兴安岭野生 2), 说明仅以单一化学成分作为指标具有一定局限性, 2015 版药典规定赤芍测定指标以芍药苷含量为标准是不完善的, 应对多指标综合测评。从药理角度分析, 儿茶素具有抗氧化、抗诱变、抗光学损伤、清除自由基等多种生理功能^[12-13]; 芍药内酯苷具有镇痛、镇静、抗惊厥、护肝等作用^[14]; 芍药苷是芍药的重要活性成分, 尤其在抗肿瘤、抗抑郁、免疫调节等有突出作用^[15], 赤芍的药效是各种同成分协同作用下的结果, 所以评价药材优劣时要兼顾多种成分。同时也不排除有些成分为有害成分, 含量高则导致药效降低或有毒性, 若明确其中关系还需对药理实验深入研究。

本研究通过 21 批不同产地赤芍的指纹图谱研究, 系统聚类分析和灰色关联度分析法, 综合评价了不同产地赤芍药材的质量, 所运用的方法准确、可靠, 可为赤芍药材质量评价和标准研究提供方法依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 丁雯, 钱大玮, 刘培, 等. 不同提取溶剂对当归赤芍药对主要活性成分溶出率的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 916-919.
- [3] Shi Y H, Zhu S, Ge Y W, *et al.* Monoterpene derivatives with anti-allergic activity from red peony root, the root of *Paeonia lactiflora* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 108(11): 55-61.
- [4] 陆小华, 马骁, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.
- [5] 杨玉, 王帅, 孟宪生, 等. 赤芍总苷对人肝癌 SMMC-7721 细胞迁移的影响及作用机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 108-112.
- [6] 聂磊, 胡震, 罗国安, 等. 中药指纹图谱的融合技术 [J]. 分析化学, 2005, 33(6): 898-898.
- [7] 王巧, 刘荣霞, 于海兰, 等. 白芍与赤芍 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(8): 581-584.
- [8] 孙冬梅, 陈秋谷, 毕晓黎, 等. 二基原赤芍 HPLC 指纹图谱的建立和 5 种成分的含量测定 [J]. 中药材, 2018, 41(4): 898-903.
- [9] 瞿领航, 曹国胜, 涂济源, 等. 基于灰色关联度与正交偏最小二乘法分析的苍术挥发油燥性谱效关系研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 150-156.
- [10] 徐珍珍, 史星星, 樊旭蕾, 等. 基于灰色关联度法和 FCM 算法的木香质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5916-5922.
- [11] 向楚兵, 刘友平, 陈鸿平, 等. 赤芍二基源药材的 HPLC 指纹图谱鉴别及质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 43-48.
- [12] Rieko Y, Kaori S, Kenichi Y, *et al.* Identification of epigallocatechin-3-gallate in green tea polyphenols as a potent inducer of p53-dependent apoptosis in the human lung cancer cell line A549 [J]. *Toxicol Vitro*, 2009, 23(5): 830-839.
- [13] Rathore K, Choudhary S, Odoi A, *et al.* Green tea catechin intervention of reactive oxygen species-mediated ERK pathway activation and chronically induced breast cells carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 174-183.
- [14] 王成龙. 基于白芍养血柔肝功效的芍药苷、芍药内酯苷药理作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [15] 冯伟科, 郭平. 芍药苷药理作用研究进展 [J]. 山东中医杂志, 2019, 38(1): 105-108.