基于熵权法和灰色关联度分析法的夏枯草质量评价Δ

李国超*，卢慧娟，姬生国#（广东药科大学中药学院，广州 510006）

中图分类号 R932；917 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2022）24-2995-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.24.10

摘 要 目的 通过测定迷迭香酸、总黄酮、水分及水溶性浸出物的含量，同时结合熵权法和灰色关联度分析法评价夏枯草药材的质量。**方法** 采用高效液相色谱法测定迷迭香酸含量；采用紫外分光光度法测定总黄酮含量；按照《中国药典》（四部）通则测定水分及水溶性浸出物含量；采用熵权法计算迷迭香酸等4个指标的权重，同时结合灰色关联度分析法计算各指标的相对关联度并对117批夏枯草的质量进行排序。**结果** 迷迭香酸、总黄酮、水分及水溶性浸出物的含量分别为0.237 1%～0.943 0%、2.923 6%～6.400 7%、8.736 7%～12.446 3%、11.638 8%～19.166 2%；权重分别为0.297 1、0.277 5、0.163 7、0.261 6；相对关联度为0.159 3～0.616 3，以S24批样品的关联度最高（0.616 3），其中江苏南京产夏枯草的相对关联度为0.500 9～0.616 3，排名靠前。**结论** 以迷迭香酸、总黄酮、水分及水溶性浸出物含量为评价指标，采用熵权法和灰色关联度分析法可用于夏枯草的质量评价；不同批次夏枯草质量存在差异，以江苏南京产夏枯草质量最优。

关键词 夏枯草；含量测定；熵权法；灰色关联度；质量评价

Quality evaluation of *Prunella vulgaris* based on entropy weight method and grey correlation degree analysis method

LI Guochao, LU Huijuan, JI Shengguo (School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To evaluate the quality of *Prunella vulgaris* by entropy weight method combined with grey correlation degree analysis method by determining the contents of rosmarinic acid, total flavonoids, water and water-soluble extract. **METHODS** The content of rosmarinic acid was determined by HPLC; the content of total flavonoids was determined by UV spectrophotometry; the contents of water and water-soluble extract were determined according to the general rules of *Chinese Pharmacopoeia* (part Ⅳ). The weight coefficients of four indexes as rosmarinic acid were calculated by entropy weight method, and the relative correlation degree of each index was analyzed by grey correlation degree analysis method, and the quality of 117 batches of *P. vulgaris* was ranked. **RESULTS** The contents of rosmarinic acid, total flavonoids, water and water-soluble extractive were 0.237 1%-0.943 0%, 2.923 6%-6.400 7%, 8.736 7%-12.446 3%, 11.638 8%-19.166 2%, respectively. The weight coefficients were 0.297 1, 0.277 5, 0.163 7 and 0.261 6, respectively. The relative correlation degrees were 0.159 3-0.616 3, and the correlation degree of S24 batch of samples was the highest (0.616 3); that of *P. vulgaris* from Nanjing of Jiangsu Province ranged from 0.500 9 to 0.616 3, ranking the first. **CONCLUSIONS** Using the contents of rosmarinic acid, total flavonoids, water and water-soluble extract as indexes, entropy weight method and grey correlation degree analysis method can be used to evaluate the quality of *P. vulgaris*. The quality of different batches of *P. vulgaris* are different, and the quality of *P. vulgaris* produced in Nanjing of Jiangsu Province is the best.

KEYWORDS *Prunella vulgaris*; content determination; entropy weight method; grey correlation degree; quality evaluation

夏枯草为唇形科植物夏枯草*Prunella vulgaris* L.的干燥果穗，以其夏季果穗呈棕红色时采收，除去杂质，晒干入药，该药材性寒、味辛、苦，归肝、胆经，具有清肝明目、消肿散结的功效[1]，临床常用于治疗甲状腺肿大、淋巴结核、乳腺增生、肺结核、急性黄疸型传染性肝炎、高血压等症[2-3]。夏枯草现收载于2020年版《中国药典》（一部），以迷迭香酸为指标成分[1]。现代研究表明，夏枯草主要含有黄酮类、酚酸类、三萜类、甾体类等化合物，具有降血压、降血糖、抗菌、抗病毒、抗炎和抗肿瘤等活性[3-4]。其中黄酮类化合物为夏枯草的主要活性成分之一，具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤、调节免疫及保护心血管等药理作用[5]，与夏枯草药理作用有较大关联性。目前夏枯草的质量研究主要为传统生药学鉴别[6]、指纹图谱[7]等，但传统生药学鉴别的主观影响较大，干扰因素较多；

Δ**基金项目** 广东省科技计划项目（No.2019A141405024）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：资源开发与品质评价。E-mail：1639896959@qq.com

＃**通信作者** 教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药资源、中药质量标准及中药新药研发。电话：020-39352425。E-mail：shengguo_ji@163.com

指纹图谱只能从化学成分方面进行考察，无法全面、综合地评价夏枯草质量。基于此，本研究以10个产地的117批夏枯草饮片为研究对象，以迷迭香酸、水分、水溶性浸出物及总黄酮含量为评价指标，采用熵权法计算权重，同时结合灰色关联度分析法计算关联度，旨在为全面、客观评价夏枯草的质量提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有1120型高效液相色谱仪、BIY211b型电子天平、AY120型十万分之一天平（日本Shimadzu公司），LK-400型手提式高速中药粉碎机（温岭市创力药材器械厂），KQ-500DE型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），UV-1800型紫外分光光度计（北京北分瑞利分析仪器公司），SHB-Ⅲ型循环式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

迷迭香酸对照品（批号14020115，纯度≥98%）、芦丁对照品（批号12040302，纯度≥98%）均购自成都曼思特生物科技有限公司；甲醇为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为双蒸水。

117批夏枯草饮片于2019年6月购自江苏南京、安徽亳州、河南新乡等10个产地，经广东药科大学中药学院姬生国教授鉴定为唇形科植物夏枯草*P. vulgaris* L.的干燥果穗。样品经干燥后粉碎，过24目筛，保存于自封袋中，置于干燥器中备用。夏枯草饮片的信息来源见表1。

表1 夏枯草饮片的信息来源

编号	产地	编号	产地
S1～S15	江苏省淮安市	S54～S62	河南省南阳市
S16～S25	江苏省南京市	S63～S88	安徽省亳州市
S26～S33	河南省洛阳市	S89～S97	湖北省随州市
S34～S45	河南省驻马店市	S98～S111	湖北省咸宁市
S46～S53	河南省新乡市	S112～S117	广西壮族自治区南宁市

2 方法与结果

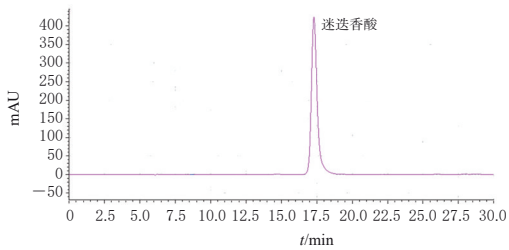
2.1 迷迭香酸的含量测定

2.1.1 色谱条件 以ODS-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱，以甲醇-0.1%三氟乙酸溶液（42∶58，*V/V*）为流动相；流速为0.6 mL/min；柱温为30 ℃；检测波长为330 nm；进样量为5 μL。

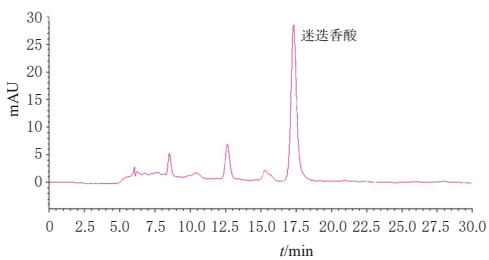
2.1.2 对照品溶液的制备 取迷迭香酸对照品5.09 mg，精密称定，置于10 mL容量瓶中，加稀乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制成迷迭香酸质量浓度为0.509 0 mg/mL的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取样品0.25 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入稀乙醇25 mL，超声（功率90 W，频率59 kHz）处理30 min，放冷，再次称定质量，用稀乙醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.4 系统适用性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液及空白溶液（稀乙醇），按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图（图1，空白图略）。结果显示，迷迭香酸峰形稳定，与供试品中的其他色谱峰达到基线分离，理论板数为17 718。



A. 对照品溶液



B. 供试品溶液（编号S93）

图1 供试品溶液、迷迭香酸对照品溶液的HPLC图

2.1.5 线性关系考察 取“2.1.2”项下对照品溶液1.0、1.0、1.0、2.0、1.0、1.0、1.0 mL，分别置于2、5、10、25、25、50、100 mL容量瓶中，用稀乙醇定容，摇匀，得系列线性溶液。取上述系列线性溶液及对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以质量浓度为横坐标（*X*）、峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归。结果显示，迷迭香酸的回归方程为$Y=2\times10^{7}X-65\ 910$（$r=0.999\ 9$），表明迷迭香酸的检测质量浓度在0.005 09～0.509 0 mg/mL范围内线性关系良好。

2.1.6 方法学考察 （1）精密度试验：取“2.1.2”项下对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果显示，迷迭香酸峰面积的RSD为0.27%（$n=6$），表明仪器精密度良好。（2）稳定性试验：取“2.1.3”项下供试品溶液（编号S93），于室温下放置0、2、4、6、12、24 h时，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示，迷迭香酸峰面积的RSD为2.6%（$n=6$），表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。（3）重复性试验：取样品（编号S93）0.25 g，共6份，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并按标准曲线法计算迷迭香酸的含量。结果显示，迷迭香酸含量的RSD为0.80%（$n=6$），表明方法的重复性良好。（4）加样回收率试验：精密称取已知含量的样品（编号S93，迷迭香酸含量为0.504 6%）0.1 g，共6份，分别精密加入对照品0.5 mg，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”项下色谱

条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率。结果显示，迷迭香酸的平均加样回收率为100.14%（RSD=0.48%，n=6），表明方法的准确度良好。

2.1.7　样品中迷迭香酸含量测定　取117批样品，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并按标准曲线法计算含量。每批样品平行测定2次。结果见表2。

表2　迷迭香酸、总黄酮、水分和水溶性浸出物含量的测定结果（n=2，%）

编号	迷迭香酸	总黄酮	水分	水溶性浸出物
S1～S15	0.320 5～0.517 5	3.251 9～5.480 1	10.351 9～10.888 3	12.538 1～17.306 5
S16～S25	0.379 7～0.943 0	5.605 7～6.400 7	10.897 6～11.707 0	15.759 2～19.166 2
S26～S33	0.417 0～0.508 0	3.445 4～3.797 3	10.435 7～10.988 7	13.440 0～14.537 8
S34～S45	0.489 7～0.645 4	5.365 0～5.993 7	10.807 0～11.496 3	13.628 0～18.728 1
S46～S53	0.426 2～0.476 0	4.252 0～4.891 8	11.104 0～12.189 8	14.437 1～16.528 3
S54～S62	0.418 8～0.513 4	3.196 5～3.690 2	9.880 7～10.589 3	11.638 8～12.637 5
S63～S88	0.276 7～0.883 2	3.851 4～5.273 8	8.736 7～12.446 3	12.588 6～14.950 0
S89～S97	0.504 6～0.635 9	4.429 6～5.307 4	9.360 1～10.065 8	15.487 7～16.3575
S98～S111	0.331 1～0.394 0	2.923 6～3.394 0	11.232 8～11.929 7	11.890 0～12.888 7
S112～S117	0.237 1～0.299 1	3.047 3～3.478 5	11.992 3～12.381 4	13.570 0～14.247 2

2.2　总黄酮的含量测定

2.2.1　对照品溶液的制备　精密称定芦丁对照品4.970 0 mg，用50%乙醇溶解并定容，制得芦丁质量浓度为0.198 8 mg/mL的对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液的制备　精密称定样品粉末0.5 g，精密加入50%乙醇15 mL，超声（功率300 W，40 KHz）提取75 min，滤过，即得。

2.2.3　检测波长的选择　精密移取上述对照品溶液1 mL，置于10 mL容量瓶中，加入1% $AlCl_3$溶液3 mL、醋酸钠-冰醋酸缓冲液1 mL，然后用50%乙醇定容，摇匀，于40 ℃恒温水浴加热10 min；取上述供试品溶液同法操作。以50%乙醇为空白对照，在250～800 nm波长范围内扫描，结果显示，对照品和供试品溶液均在285 nm波长处有最大吸收，故选择检测波长为285 nm（图略）。

2.2.4　线性关系考察　精密量取上述对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL，分别置于10 mL容量瓶中，按“2.2.3”项下方法显色后，于285 nm波长处测定吸光度，以质量浓度为横坐标（X）、吸光度为纵坐标（Y）进行线性回归。结果显示，芦丁的回归方程为Y=17.051 0X+0.041 4（r=0.999 8），表明芦丁的检测质量浓度在0.009 9～0.079 5 mg/mL范围内线性关系良好。

2.2.5　方法学考察　（1）精密度试验：取“2.2.2”项下供试品溶液（编号S104），按“2.2.3”项下方法显色后，于285 nm波长处连续测定6次吸光度。结果显示，吸光度的RSD为0.05%（n=6），表明方法精密度良好。（2）稳定性试验：取“2.2.2”项下供试品溶液（编号S104），按“2.2.3”项下方法显色后，在室温下静置0、30、60、90、120、180 min时，于285 nm波长处测定吸光度。结果显示，吸光度的RSD为1.90%（n=6），表明样品在室温下放置180 min内稳定性良好。（3）重复性试验：取“2.2.2”项下供试品溶液（编号S104），按“2.2.3”项下方法显色后，于285 nm波长处测定吸光度并按标准曲线法计算样品含量。结果显示，总黄酮含量的RSD为2.38%（n=6），表明方法重复性良好。（4）加样回收率试验：取已知含量的样品（编号S104，总黄酮含量为4.133 1%），共6份，每份1 g，精密称定，加入芦丁对照品4.1 mg，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.3”项下方法显色后，于285 nm波长处测定吸光度并计算加样回收率。结果显示，芦丁的平均加样回收率为99.49%（RSD=1.03%，n=6），表明方法的准确度良好。

2.2.6　样品中总黄酮含量测定　取117批样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.3”项下方法显色后，于285 nm波长处测定吸光度并按标准曲线法计算含量。每批样品平行测定2次。结果见表2。

2.3　水分含量测定

按2020年版《中国药典》（四部）通则“0832水分测定法”项下第二法“烘干法”测定水分含量[8]。每批样品平行测定2次。结果见表2。

2.4　水溶性浸出物含量测定

按2020年版《中国药典》（四部）通则“2201浸出物测定法”项下水溶性浸出物测定法中的“热浸法”测定水溶性浸出物含量[8]。每批样品平行测定2次。结果见表2。

2.5　熵权法计算各指标权重

设有m个样品，每个样品有n项评价指标，由此组成单元序列$\{X_{ij}\}$（i=1、2、3……m；j=1、2、3……n；本研究中n=4，m=117）。由于各指标间量纲不统一，需对原始数据进行标准化处理。如果评价指标为正向指标，则采用公式（1）进行标准化处理；如果指标为负向指标，则采用公式（2）进行标准化处理。Y_{ij}为标准化处理后的数据，X_{ij}为第i个样品的第j个指标值。

$$Y_{ij}=\frac{X_{ij}-\min(X_{ij})}{\max(X_{ij})-\min(X_{ij})} \quad \cdots\cdots (1)$$

$$Y_{ij}=\frac{\max(X_{ij})-X_{ij}}{\max(X_{ij})-\min(X_{ij})} \quad \cdots\cdots (2)$$

根据信息论中信息熵的定义，按公式（3）、（4）计算各个指标的信息熵（E），E_j为样品第j个指标的信息熵，若P_{ij}=0，则定义lnP_{ij}=0；再按公式（5）计算各指标的权重（W_j）[9－10]。结果见表3。

$$P_{ij}=\frac{Y_{ij}}{\sum_{i=1}^{n} Y_{ij}} \quad \cdots\cdots (3)$$

$$E_j=\frac{1}{\ln n}\sum_{i=1}^{n} p_{ij}\ln(p_{ij}) \quad \cdots\cdots (4)$$

$$W_j=\frac{1-E_j}{\sum_{i=1}^{n}(1-E_j)} \quad \cdots\cdots (5)$$

表3　各指标的信息熵及权重结果

指标	信息熵	W_j
迷迭香酸	0.958 3	0.297 1
总黄酮	0.961 1	0.277 5
水分	0.977 0	0.163 7
水溶性浸出物	0.963 3	0.261 6

2.6　灰色关联度分析法计算各指标的相对关联度

2.6.1　无量纲化处理　在灰色关联度分析中，首先确定评价单元序列：设有 m 个样品，每个样品有 n 项评价指标，由此组成单元序列 $\{X_{ik}\}$（i=1、2、3……m；k=1、2、3……n）。多指标评价中因各指标单位、量级不同，无法进行直接评价，故需对原始数据进行无量纲化处理，计算公式为 $Y_{ik}=X_{ik}/X_k$，Y_{ik} 为处理后的数据，$\{X_{ik}\}$ 为原始数据，$\{X_k\}$ 为样品第 k 个指标的平均值[10]。

2.6.2　相对关联度的计算　迷迭香酸、总黄酮、水溶性浸出物含量为正向指标，关联系数 $\xi^i_{k(s)}$ 按公式（6）计算（n=3，m=117，ρ 为“2.5”中熵权法计算所得的权重）；水分含量为负向指标，关联系数 $\xi^i_{k(t)}$ 按公式（7）计算（n=1，m=117，ρ 为“2.5”中熵权法计算所得的权重）；再按公式（8）计算相对关联度（r_i）[11]。结果见表4。

$$\xi^i_{k(s)}=\frac{\Delta\min+\rho\Delta\max}{|Y_{ik}-Y_{sk}|+\rho\Delta\max},r_{i(s)}=\frac{\sum_{k=1}^{n}+\varepsilon^i_{k(s)}}{n} \quad \cdots\cdots (6)$$

$$\varepsilon^i_{k(t)}=\frac{\Delta\min+\rho\Delta\max}{|Y_{ik}-Y_{tk}|+\rho\Delta\max},r_{i(t)}=\frac{\sum_{k=1}^{n}+\varepsilon^i_{k(t)}}{n} \quad \cdots\cdots (7)$$

$$\Delta\min=\min|Y_{ik}-Y_{sk}|,\Delta\max=\max|Y_{ik}-Y_{sk}|,r_i=\frac{r_{i(s)}}{r_{i(s)}+r_{i(t)}} \quad \cdots\cdots (8)$$

表4　117批夏枯草的相对关联度及排序结果

编号	r_i	排名	编号	r_i	排名
S1	0.464 5	65	S60	0.384 8	91
S2	0.403 7	82	S61	0.317 6	111
S3	0.469 4	63	S62	0.342 8	107
S4	0.485 5	50	S63	0.533 5	18
S5	0.482 6	55	S64	0.444 6	74
S6	0.464 7	64	S65	0.429 4	79
S7	0.473 8	59	S66	0.453 7	69
S8	0.463 0	66	S67	0.451 2	70
S9	0.484 8	52	S68	0.458 3	68
S10	0.476 9	57	S69	0.447 8	72
S11	0.480 5	56	S70	0.436 4	78
S12	0.368 1	98	S71	0.444 3	75
S13	0.382 4	93	S72	0.531 5	19
S14	0.364 1	100	S73	0.521 2	23
S15	0.380 9	95	S74	0.510 5	32
S16	0.604 1	3	S75	0.519 7	26
S17	0.601 1	4	S76	0.505 8	36
S18	0.559 7	11	S77	0.542 5	14
S19	0.608 9	2	S78	0.543 1	12
S20	0.573 8	8	S79	0.521 0	24
S21	0.575 5	7	S80	0.159 3	117
S22	0.584 1	6	S81	0.257 0	115
S23	0.594 2	5	S82	0.241 5	116
S24	0.616 3	1	S83	0.299 8	114
S25	0.500 9	41	S84	0.316 1	112
S26	0.441 4	76	S85	0.358 1	104
S27	0.439 0	77	S86	0.348 3	106
S28	0.401 2	85	S87	0.335 8	109
S29	0.400 8	86	S88	0.340 2	108
S30	0.397 9	87	S89	0.363 1	101
S31	0.402 1	83	S90	0.381 5	94
S32	0.429 1	81	S91	0.402 0	84
S33	0.429 3	80	S92	0.366 7	99
S34	0.495 8	45	S93	0.378 1	96
S35	0.495 1	46	S94	0.375 1	97
S36	0.522 9	22	S95	0.397 0	88
S37	0.470 1	62	S96	0.301 4	113
S38	0.503 1	39	S97	0.331 7	110
S39	0.492 0	47	S98	0.475 2	58
S40	0.484 6	54	S99	0.485 0	51
S41	0.449 2	71	S100	0.485 7	48
S42	0.471 6	61	S101	0.445 1	73
S43	0.570 6	9	S102	0.498 0	43
S44	0.542 7	13	S103	0.530 8	20
S45	0.539 5	16	S104	0.536 3	17
S46	0.506 6	35	S105	0.501 4	40
S47	0.517 7	27	S106	0.495 9	44
S48	0.472 3	60	S107	0.485 7	49
S49	0.505 6	37	S108	0.484 6	53
S50	0.511 8	30	S109	0.539 8	15
S51	0.527 2	21	S110	0.513 6	29
S52	0.564 7	10	S111	0.503 2	38
S53	0.462 3	67	S112	0.509 7	33
S54	0.362 3	103	S113	0.511 3	31
S55	0.362 8	102	S114	0.506 7	34
S56	0.393 0	90	S115	0.500 3	42
S57	0.383 9	92	S116	0.515 9	28
S58	0.393 8	89	S117	0.520 6	25
S59	0.349 8	105			

3　讨论

2020年版《中国药典》仅以迷迭香酸为夏枯草质量控制的唯一活性指标[1]。但由于中药成分复杂，其药效的发挥往往是多个成分协同作用的结果，因此采用多指标评价的方法能更加全面表征药材的质量[12]。有研究发现，夏枯草中所含有的总黄酮具有抗肿瘤、抑菌、降血脂等活性[5]，与夏枯草的药理作用关联度大，此外药材中的水分与水溶性浸出物含量可从药材储藏期、霉变、虫蛀等方面影响药材的质量[13-14]，因此本研究选择迷迭香酸、总黄酮、水分及水溶性浸出物作为夏枯草的指标成分。含量测定结果显示，从迷迭香酸、总黄酮和水溶性浸出物含量来看，以江苏南京（S16～S25）、安徽亳州（S63～S88）等产地药材的含量较高（质量较优）；从水分含量来看，以湖北随州（S89～S97）、河南南阳（S54～S62）等产地药材的含量较低（质量较优）。不同指标的含量测定结果存在差异，因此多指标综合评价夏枯草质量更加科学。

（下转第3004页）