

· 基础研究 ·

基于灰色关联度法的药用蚂蚁品质探析

朱莹莹¹, 郭巧生^{1*}, 赵开军², 于尚平¹

1. 南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210018;

2. 南京中山制药有限公司, 江苏 南京 210046

[摘要] 目的: 基于灰色关联度分析法建立不同基原与产地蚂蚁药材的质量评价方法。方法: 参照《中华人民共和国药典》2020年版方法对药用蚂蚁的杂质、水分、灰分及浸出物含量进行测定; 利用电感耦合等离子体-质谱法(ICP-MS)、凯氏定氮仪、气相色谱法(GC)、氨基酸分析仪对药用蚂蚁微量元素、总氮、蚁酸和氨基酸含量进行测定; 以灰色关联度分析中的相对关联度为测度, 建立灰色关联度模型, 对蚂蚁药材质量进行初步评价。结果: 12批药用蚂蚁样品的相对关联度为0.296~0.576, 其中有2个产地药用蚂蚁样品的相对关联度>0.500, 有4个产地药用蚂蚁样品的相对关联度为0.400~0.500。贵州凯里市的叶形多刺蚁样品、江西上高县的双齿多刺蚁样品、广西博白县的双齿多刺蚁样品相对关联度排名居前3位, 说明其药材质量较优。结论: 基于灰色关联度分析法可综合评价药用蚂蚁药材质量, 为药用蚂蚁资源的开发与利用、质量评价方法的建立提供参考。

[关键词] 双齿多刺蚁; 叶形多刺蚁; 灰色关联度分析; 质量评价

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)04-0804-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220310002

Quality Evaluation of Medicinal Ants by Grey Relation Analysis

ZHU Ying-ying¹, GUO Qiao-sheng^{1*}, ZHAO Kai-jun², YU Shang-ping¹

1. Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210018, China;

2. Nanjing Zhongshan Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210046, China

[Abstract] **Objective:** To establish the quality evaluation method for the medicinal ants from different producing areas based on the grey relation analysis. **Methods:** The content of impurities, moisture, ash, and extract of medicinal ants was determined according to the methods in the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. The content of trace elements, total nitrogen, formic acid, and amino acids in medicinal ants was determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry, micro-Kjeldahl method, gas chromatography, and an automatic amino acid analyzer, respectively. The grey correlation model was established with relative correlation degree to comprehensively evaluate the quality of medicinal ants. **Results:** The relative correlation degrees of all the samples were within the range of 0.296-0.576. The samples from two and four producing areas had the relative correlation degrees greater than 0.500 and of 0.400-0.500, respectively. The relative correlation degrees of *Polyrhachis lamellidens* Smith in Kaili, Guizhou, *P. dives* Smith in Shanggao, Jiangxi, and *P. dives* in Bobai, Guangxi ranked the top three, which indicated that they had better quality. **Conclusion:** The quality of medicinal ants can be comprehensively evaluated by grey relation analysis, which can provide a reference for the development and utilization of medicinal ant resources and the establishment of quality evaluation methods.

[Keywords] *Polyrhachis dives* Smith; *P. lamellidens* Smith; grey relation analysis; quality evaluation

蚂蚁是蚁科(Formicidae)昆虫的总称,是陆地上分布最广泛、种类和数量最多的社会性昆虫,除了南北极和高山雪线以上的地区均有分布^[1]。蚂蚁不仅具有经济价值和生态意义,部分品种的蚂蚁还具

有重要的食药用功能。我国已有2000多年的蚂蚁药用历史,且药用习惯表现出典型的地域差异。汉代民间治疗筋骨软弱的“金刚丸”即为蚂蚁粉蜜制而成的药丸。明代李时珍^[2]在《本草纲目》中详细记载

* [通信作者] 郭巧生,教授,研究方向:中药资源; Tel: 025-84395980, E-mail: gqs@njau.edu.cn

了蚂蚁的习性、毒性和食疗作用。清代赵学敏^[3]的《本草纲目拾遗》中记载山蚂蚁窠可治“久不收口之烂疮、刀伤出血、秃疮”等，山蚂蚁可“合壮药”，即认为蚂蚁属于补益类药材。蚂蚁味咸、酸，性平，一般认为归肝、肾经，具有扶正固本、补肾壮阳、祛瘀通络、解毒消肿之功效，用于肾虚阳痿、风湿痹症、疗毒肿痛、慢性肝炎及某些癌症的辅助治疗。据统计，目前我国已经有13个省（自治区）颁布了蚂蚁药材相关的地方标准，其中收录的药用蚂蚁品种绝大部分是双齿多刺蚁 *Polyrhachis dives* Smith（过去一直被称为拟黑多刺蚁或鼎突多刺蚁 *P. vicina* Roger。1991年，王常禄等^[4]研究证实两者乃是同物异名，并获得国际蚁学界认可。根据定名先后规则，本研究沿用“双齿多刺蚁 *P. dives* Smith”这一中文名与拉丁名），药材商品名通常称为黑蚂蚁。前期市场调查发现，叶形多刺蚁 *P. lamellidens* Smith 也被作为黑蚂蚁药材基原之一，其在我国贵州等地区具有非常广泛的药用。2种药用蚂蚁均属于多刺蚁属（*Polyrhachis*），外观形态特征极为相似，药用及保健范围也类似，因此都被作为黑蚂蚁药材，并不加以区分。

灰色关联度分析（GRA）是灰色理论的基本内容，是一种针对模糊系统研究的有效手段。基于中药成分与中药质量是一种灰色关系的认识，运用GRA评价中药质量具有一定理论基础^[5]。目前GRA已经在许多动物类药材质量评价中得到应用，如蜈蚣^[6]、地龙^[7]等。本研究以2种基原、12个不同产地的药用蚂蚁为研究对象，以药用蚂蚁中5类主要药效成分的含量为指标，建立GRA模型，以期对不同基原与产地的蚂蚁药材资源开发与利用提供参考。

1 材料

1.1 试药

12批药用蚂蚁样品信息见表1，其种属均由广西师范大学陈志林教授鉴定，分别为双齿多刺蚁 *Polyrhachis dives* Smith 和叶形多刺蚁 *P. lamellidens* Smith。

盐酸（分析纯，批号：160725196H，国药集团化学试剂有限公司）；硝酸银（分析纯，批号：20121101，科亚精细化工有限公司）；锰（Mn，1000 mg·L⁻¹，批号：GSB 04-1736-2004）、铁（Fe，1000 mg·L⁻¹，批号：GSB 04-1726-2004）、铜（Cu，

表1 药用蚂蚁药材样品来源信息

编号	物种	产地	采集或购买时间/年-月-日
1	叶形多刺蚁	贵州瓮安县	2021-03-04
2	双齿多刺蚁	贵州凯里市	2021-03-04
3	叶形多刺蚁	贵州凯里市	2021-03-04
4	双齿多刺蚁	贵州镇远县	2021-03-04
5	叶形多刺蚁	贵州镇远县	2021-03-16
6	双齿多刺蚁	江西上高县	2020-09-12
7	双齿多刺蚁	江西高安市	2021-03-25
8	双齿多刺蚁	广东英德市	2020-12-16
9	双齿多刺蚁	广东翁源县	2021-01-18
10	双齿多刺蚁	广西博白县	2020-10-17
11	双齿多刺蚁	广西田林县	2021-01-23
12	双齿多刺蚁	广西田林县	2021-03-26

1000 mg·L⁻¹，批号：GSB 04-1725-2004）、锌（Zn，1000 mg·L⁻¹，批号：GSB 04-1761-2004）均购自国家有色金属及电子材料分析测试中心；硝酸（分析纯，批号：20180718，上海凌峰化学试剂有限公司）；浓硫酸（分析纯，批号：210419047J，南京化学试剂股份有限公司）；无水乙醇（分析纯，批号：20210427）、氢氧化钠（分析纯，批号：20210406）、硼酸（分析纯，批号：20210322）均购于广东光华科技股份有限公司；对照品甲酸（色谱纯，批号：F809712）、甲酸乙酯（分析纯，批号：E809008）均购于上海麦克林生化科技有限公司；水为超纯水。

1.2 仪器

M82型中药磨粉机（山东九阳股份有限公司）；BMS-120.4型万分之一电子天平（上海卓精电子科技有限公司）；MFLC 16/12 B型马弗炉（天津市泰斯特仪器有限公司）；Milli-Q型超纯水系统（美国Millipore公司）；iCAP Qc型电感耦合等离子体质谱仪、Trace GC Ultra型气相色谱仪（美国Thermo Fisher公司）；ETHOS UP型微波消解仪（意大利Milestone公司）；KT8400型凯氏定氮仪、DT220型消化炉（丹麦福斯公司）；L-8900型氨基酸分析仪（日本Hitachi公司）。

2 方法

2.1 杂质、水分和灰分测定

参照《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）2020年版（四部）通用技术要求^[8]测定。

杂质测定：按照通则2301杂质检查法。取供试品约25 g，用肉眼或借助放大镜观察，将样品中的

泥沙、碎石、植物枯叶及种子等杂质拣出,同时注意除去供试品中混入的其他昆虫。将杂质称定质量,计算其含量。

水分测定:按照通则0832第三法测定水分含量。取供试品粉末1 g,置于已在供试品同样条件下干燥并称定质量的称量瓶中,精密称定,打开瓶盖,放入真空干燥箱中,抽气减压至2.67 kPa (≈ 20 mmHg)以下,并持续抽气30 min,室温放置24 h后打开活塞,待内外压一致,关闭活塞,打开干燥器,盖上瓶盖,取出称量瓶迅速精密称定质量,计算供试品中的含水量。

总灰分及酸不溶性灰分测定:按照通则2302测定总灰分、酸不溶性灰分含量。取供试品粉末2 g,置炽灼至恒重的坩埚中,称定质量(精确至0.01 g),缓缓炽热,注意避免燃烧,至完全炭化后,逐渐升高温度至550 $^{\circ}\text{C}$,使完全灰化并至恒重。根据供试品残渣质量,计算其总灰分的含量。取所得的灰分,在坩埚中小心加入稀盐酸约10 mL,用表面皿覆盖坩埚,置水浴上加热10 min,表面皿用5 mL热水冲洗,洗液并入坩埚中,用无灰滤纸滤过,坩埚内的残渣用水洗于滤纸上,并洗涤至洗液不显氯化物为止。滤渣连同滤纸移置同一坩埚中,干燥,炽灼直至恒重。根据供试品残渣质量,计算其酸不溶性灰分的含量。

2.2 4种主要微量元素测定

参照《中国药典》2020年版(四部)通则2321项下微波消解电感耦合等离子体-质谱法(ICP-MS)测定药用蚂蚁样品中Mn、Fe、Cu、Zn元素含量^[8]。用质量浓度均为1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Mn、Fe、Cu、Zn标准母液,以5%硝酸为介质,配成0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6个质量浓度梯度的混合对照品溶液,过0.22 μm 水系微孔滤膜,即得对照品溶液。称取供试品粉末0.2 g(精确至0.0001 g),置消煮管中,精密加入硝酸5.0 mL,微波消解仪消煮30 min。将消煮液转移至50 mL量瓶中,并用纯水洗消煮管2~3遍,最后用纯水定容至刻度。用0.22 μm 滤膜滤过,即得供试品溶液。精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL 注入电感耦合等离子体质谱仪,测定,即得。

2.3 浸出物、总氮和蚁酸含量测定

2.3.1 浸出物测定 参照《中国药典》2020年版

(四部)通则2201冷浸法测定浸出物含量^[8]:取药用蚂蚁供试品粉末1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入60%乙醇30 mL,密塞,冷浸,前6 h振摇,再静置18 h,用干燥滤器迅速滤过,精密量取续滤液15 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥3 h,置干燥器中冷却至室温,迅速精密称定质量。计算供试品中醇溶性浸出物的含量。

2.3.2 总氮量测定 参照游思亮等^[9]的方法,利用凯氏定氮仪测定。

2.3.3 蚁酸含量测定 参照邹耀华等^[10]所建立的衍生气相色谱法。经过方法学验证,该方法专属性、精密度、稳定性、加样回收率均良好。标准曲线方程为 $Y=6\,361.2X-1\,065\,114$ ($r=0.998\,9$),表明蚁酸在500~7500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 呈良好的线性关系,该方法适用于蚂蚁药材中蚁酸含量的测定。

2.4 氨基酸类成分的含量测定

参照张晓萍等^[11]的方法,利用氨基酸分析仪测得。

2.5 数据分析

采用Microsoft Excel 2019和SPSS 26.0进行相关数据分析,结果均以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示。数据差异显著性分析借助ANOVA与 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 12批药用蚂蚁样品中杂质、水分和灰分含量

12批药用蚂蚁样品中的杂质、水分和灰分含量见表2。依据《江苏省中药材标准》2016年版^[12]“蚂蚁”项下记载,杂质质量分数应 $\leq 5\%$,总灰分不得过11.0%,酸不溶性灰分不得过6.0%,对水分含量未作规定。结果表明,3、4、6、7、9、12号样品杂质符合标准,合格率仅50%。双齿多刺蚁平均含水量(2.93%)显著高于叶形多刺蚁(1.96%, $P<0.05$),其中6号江西上高县产双齿多刺蚁样品含水量(6.24%)最高。2种药用蚂蚁灰分含量略有差别,但差异无统计学意义,均符合含量限定值。灰分含量以贵州产区的蚂蚁最高。

3.2 12批药用蚂蚁样品中4种主要微量元素含量

研究发现扶正固本类中药中Mn、Fe、Cu、Zn

表 2 12 批药用蚂蚁样品中杂质、水分和灰分质量分数
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

编号	杂质	水分	总灰分	酸不溶性灰分
1	7.04±4.73 ^b	1.84±0.25 ^{de}	6.26±0.20 ^b	2.46±0.14 ^b
2	20.10±4.66 ^a	2.39±0.22 ^{cd}	8.64±0.12 ^a	3.36±0.93 ^a
3	0.71±0.94 ^c	1.89±0.04 ^{de}	4.97±0.18 ^{cd}	0.31±0.11 ^f
4	3.92±2.46 ^c	1.95±0.34 ^{de}	4.19±0.06 ^g	1.14±0.07 ^{cde}
5	20.43±14.21 ^a	2.15±0.11 ^{de}	4.79±0.07 ^{de}	1.70±0.23 ^c
6	1.12±0.16 ^c	6.24±0.13 ^a	4.54±0.03 ^f	1.21±0.03 ^{cde}
7	1.77±0.43 ^c	1.74±0.34 ^{de}	5.12±0.09 ^c	1.32±0.35 ^{cd}
8	12.15±7.30 ^{abc}	1.52±0.14 ^e	4.41±0.08 ^f	0.55±0.31 ^{efg}
9	4.29±0.83 ^c	3.75±0.46 ^b	3.97±0.05 ^h	0.77±0.02 ^{def}
10	18.04±14.07 ^{ab}	2.26±0.90 ^d	4.60±0.23 ^{ef}	0.06±0.10 ^g
11	6.14±0.66 ^c	2.96±0.06 ^c	4.02±0.06 ^{gh}	0.96±0.07 ^{def}
12	3.53±0.57 ^c	3.61±0.24 ^b	3.92±0.03 ^h	0.91±0.55 ^{def}

注：同列不同小写字母表示 $P<0.05$ ；表 3~表 5 同。

元素的含量相对较高^[13]。基于蚂蚁“合壮药”的记载，对不同产地 2 种基原药用蚂蚁中 4 种微量元素的含量进行测定，结果见表 3。叶形多刺蚁中 4 种元素平均质量分数分别为 263.29、1 048.03、25.69、129.06 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ；双齿多刺蚁中 4 种元素平均质量分数分别为 255.86、643.82、25.77、112.10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。经 t 检验，叶形多刺蚁中 Zn 元素含量显著高于双齿多刺蚁 ($P<0.05$)，其他 3 种元素含量种间差异无统计学意义。除 Cu 元素外，不同产地药用蚂蚁其余 3 种元素的差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。广西产区样品中 Mn、Zn 元素含量高于其他产区，江西产区样品中 Fe 元素含量最高。

3.3 12 批药用蚂蚁样品中浸出物、总氮和蚁酸含量

叶形多刺蚁浸出物质量分数为 17.70%~27.30%，均值为 21.74%；双齿多刺蚁浸出物质量分数为 14.16%~33.91%，均值为 22.32%。经 t 检验，双齿多刺蚁浸出物质量分数高于叶形多刺蚁，但差异无统计学意义。就产地差异来看，浸出物质量分数顺序为广东 (27.30%) > 江西 (25.49%) > 广西 (22.10%) > 贵州 (叶形多刺蚁，21.74%) > 贵州 (双齿多刺蚁，14.52%)。贵州产区的双齿多刺蚁含量显著低于其他产区的双齿多刺蚁 ($P<0.05$)，亦显著低于贵州产区的叶形多刺蚁 ($P<0.05$)；不同基原与产地的蚂蚁药材样品浸出物质量分数均能达到 15% 限定值 (表 4)。

12 批药用蚂蚁样品中，叶形多刺蚁总氮质量分数为 7.51%~10.12%，均值为 8.57%；双齿多刺蚁总氮质量分数为 7.24%~9.74%，均值为 8.04%。经 t 检验，叶形多刺蚁总氮质量分数高于双齿多刺蚁，但差异无统计学意义。就产地差异来看，总氮质量分数顺序为广西 (8.70%) > 贵州 (叶形多刺蚁，8.57%) > 广东 (7.95%) > 贵州 (双齿多刺蚁，7.73%) > 江西 (7.46%)，广西产区的双齿多刺蚁样品总氮量最高，江西最低 (表 4)。

蚁酸为药用蚂蚁的特征性成分之一，具有重要的药理作用。12 批蚂蚁样品中，叶形多刺蚁蚁酸质量分数为 9.93~56.49 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，均值为 36.50 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ；双齿多刺蚁蚁酸质量分数为 9.68~114.01 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，均值为 75.97 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。双齿多刺蚁蚁酸质量分数显

表 3 12 批药用蚂蚁样品中 4 种微量元素的质量分数 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

编号	Mn	Fe	Cu	Zn	总量
1	254.99±19.32 ^c	1 685.95±56.15 ^a	23.92±1.68 ^{de}	136.65±12.17 ^b	2 101.50±86.15 ^a
2	271.55±6.27 ^d	839.80±47.47 ^c	22.21±0.76 ^e	93.10±1.81 ^c	1 226.66±53.12 ^c
3	358.60±7.27 ^b	451.16±45.31 ^{ef}	30.84±1.23 ^a	125.20±1.99 ^c	965.80±39.21 ^{ef}
4	193.11±8.90 ^g	459.74±33.51 ^{ef}	24.21±1.43 ^d	109.83±4.12 ^d	786.89±47.48 ^h
5	176.28±9.76 ^h	1 006.97±116.45 ^b	22.31±1.18 ^c	125.32±11.91 ^c	1 330.88±115.72 ^b
6	209.21±8.30 ^f	848.20±32.54 ^c	28.51±1.28 ^b	104.36±3.36 ^d	1 190.28±45.47 ^c
7	277.18±4.00 ^d	989.67±10.23 ^b	24.19±0.67 ^d	108.77±5.36 ^d	1 399.81±20.08 ^b
8	185.99±4.77 ^{gh}	535.99±21.76 ^e	26.48±0.73 ^c	111.93±2.89 ^d	860.39±27.89 ^{gh}
9	222.92±2.44 ^f	533.73±13.13 ^c	25.55±0.18 ^{cd}	105.85±2.69 ^d	888.06±13.04 ^{fg}
10	222.94±9.32 ^f	513.26±29.50 ^c	24.50±1.00 ^d	110.27±5.15 ^d	870.97±44.68 ^{gh}
11	299.93±5.32 ^c	654.58±28.54 ^d	25.68±0.70 ^{cd}	115.56±3.75 ^{cd}	1 095.75±34.56 ^d
12	419.97±5.40 ^a	419.42±18.26 ^f	30.67±0.37 ^a	149.24±7.52 ^a	1 019.29±16.33 ^{de}

表 4 12 批药用蚂蚁样品中浸出物、总氮和蚁酸质量分数
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

编号	浸出物/%	总氮/%	蚁酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	20.23 $\pm$ 0.81 ^{de}	7.51 $\pm$ 0.01 ^e	56.49 $\pm$ 0.92 ^e
2	14.16 $\pm$ 0.76 ^h	8.22 $\pm$ 0.05 ^c	56.75 $\pm$ 1.26 ^e
3	27.30 $\pm$ 0.81 ^{bc}	10.12 $\pm$ 0.05 ^a	43.08 $\pm$ 1.77 ^f
4	14.88 $\pm$ 4.39 ^{gh}	7.24 $\pm$ 0.05 ^f	55.23 $\pm$ 0.41 ^e
5	17.70 $\pm$ 1.69 ^{ef}	8.08 $\pm$ 0.05 ^c	9.93 $\pm$ 0.31 ^g
6	33.91 $\pm$ 1.13 ^a	7.65 $\pm$ 0.10 ^e	114.01 $\pm$ 0.82 ^a
7	17.06 $\pm$ 1.23 ^{fg}	7.27 $\pm$ 0.09 ^f	75.91 $\pm$ 1.44 ^d
8	29.20 $\pm$ 0.21 ^b	8.03 $\pm$ 0.08 ^c	103.29 $\pm$ 4.77 ^c
9	25.40 $\pm$ 0.37 ^c	7.86 $\pm$ 0.06 ^d	105.12 $\pm$ 2.64 ^b
10	26.95 $\pm$ 0.95 ^{bc}	8.15 $\pm$ 0.08 ^c	108.42 $\pm$ 3.53 ^b
11	21.66 $\pm$ 0.76 ^d	8.20 $\pm$ 0.18 ^c	55.34 $\pm$ 1.45 ^e
12	17.68 $\pm$ 0.23 ^{ef}	9.74 $\pm$ 0.21 ^b	9.68 $\pm$ 0.30 ^g

著高于叶形多刺蚁 ($P<0.05$)。就产地差异来看, 蚁酸质量分数顺序为广东 ($104.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) > 江西 ($94.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) > 广西 ($57.81 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) > 贵州

(双齿多刺蚁, $55.99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) > 贵州 (叶形多刺蚁, $36.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。贵州、广西两地的双齿多刺蚁样品蚁酸含量显著低于江西、广东 ($P<0.05$)。

3.4 12 批药用蚂蚁样品中氨基酸类成分含量

12 批药用蚂蚁样品中水解氨基酸种类丰富, 均检测出 17 种氨基酸, 包含 7 种人体必需氨基酸 (EAA)。叶形多刺蚁总氨基酸 (TAA) 质量分数为 37.32%~52.52%, 均值为 43.20%; 总 EAA 质量分数为 12.74%~18.27%, 均值为 15.09%。双齿多刺蚁 TAA 质量分数为 35.24%~47.05%, 均值为 38.96%; 总 EAA 质量分数为 12.08%~16.07%, 均值为 13.46%。叶形多刺蚁氨基酸质量分数高出双齿多刺蚁约 12%, 但差异无统计学意义。12 批药用蚂蚁氨基酸含量存在产地差异, TAA 质量分数贵州 (41.12%) > 广西 (41.06%) > 广东 (38.66%) > 江西 (36.66%), 总 EAA 含量趋势相同 (表 5)。

表 5 12 批药用蚂蚁样品中水解氨基酸质量分数 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

%

编号	Asp	Thr [*]	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val [*]	Met [*]	Ile [*]
1	2.81 $\pm$ 0	1.63 $\pm$ 0.01	2.00 $\pm$ 0.02	3.97 $\pm$ 0	4.82 $\pm$ 0.10	3.61 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0	2.58 $\pm$ 0.04	1.49 $\pm$ 0.03	1.68 $\pm$ 0.01
2	3.30 $\pm$ 0.02	1.76 $\pm$ 0.01	2.15 $\pm$ 0.01	4.51 $\pm$ 0.01	4.78 $\pm$ 0.05	3.55 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0	2.62 $\pm$ 0.02	1.56 $\pm$ 0	1.84 $\pm$ 0.01
3	4.00 $\pm$ 0.03	2.30 $\pm$ 0.01	2.83 $\pm$ 0.01	5.58 $\pm$ 0.05	6.75 $\pm$ 0.06	4.98 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0	3.74 $\pm$ 0.03	2.09 $\pm$ 0	2.42 $\pm$ 0.02
4	3.00 $\pm$ 0.03	1.61 $\pm$ 0.02	1.99 $\pm$ 0.04	4.20 $\pm$ 0.01	4.20 $\pm$ 0.18	3.15 $\pm$ 0.11	0.22 $\pm$ 0	2.36 $\pm$ 0.07	1.40 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.03
5	3.01 $\pm$ 0.02	1.84 $\pm$ 0.02	2.35 $\pm$ 0.03	3.97 $\pm$ 0.01	5.86 $\pm$ 0.14	4.14 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0	2.99 $\pm$ 0.06	1.77 $\pm$ 0.03	1.86 $\pm$ 0.02
6	2.96 $\pm$ 0.03	1.65 $\pm$ 0.02	2.02 $\pm$ 0.02	4.17 $\pm$ 0.04	4.90 $\pm$ 0.07	3.76 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0	2.73 $\pm$ 0.03	1.47 $\pm$ 0.02	1.82 $\pm$ 0.02
7	2.99 $\pm$ 0.04	1.59 $\pm$ 0.03	1.90 $\pm$ 0.05	4.13 $\pm$ 0.04	4.05 $\pm$ 0.18	3.11 $\pm$ 0.11	0.20 $\pm$ 0	2.30 $\pm$ 0.08	1.38 $\pm$ 0.04	1.66 $\pm$ 0.03
8	3.04 $\pm$ 0.08	1.69 $\pm$ 0.07	2.06 $\pm$ 0.12	4.32 $\pm$ 0.07	4.76 $\pm$ 0.42	3.65 $\pm$ 0.26	0.20 $\pm$ 0.02	2.59 $\pm$ 0.16	1.54 $\pm$ 0.11	1.76 $\pm$ 0.07
9	3.08 $\pm$ 0.02	1.70 $\pm$ 0.01	2.04 $\pm$ 0	4.39 $\pm$ 0.02	4.72 $\pm$ 0.03	3.63 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.01	2.60 $\pm$ 0.02	1.48 $\pm$ 0.01	1.81 $\pm$ 0.01
10	3.14 $\pm$ 0.03	1.78 $\pm$ 0.02	2.19 $\pm$ 0.03	4.45 $\pm$ 0.03	5.26 $\pm$ 0.10	3.95 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0	2.79 $\pm$ 0.04	1.65 $\pm$ 0.02	1.88 $\pm$ 0.02
11	2.86 $\pm$ 0.05	1.54 $\pm$ 0.02	1.83 $\pm$ 0.02	4.09 $\pm$ 0.06	4.48 $\pm$ 0.04	3.27 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.01	2.47 $\pm$ 0.04	1.38 $\pm$ 0.01	1.64 $\pm$ 0.02
12	3.77 $\pm$ 0.02	2.06 $\pm$ 0.01	2.54 $\pm$ 0.02	5.25 $\pm$ 0.03	6.07 $\pm$ 0.04	4.34 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0	3.23 $\pm$ 0.02	1.92 $\pm$ 0.01	2.11 $\pm$ 0.01
编号	Leu [*]	Tyr	Phe [*]	Lys [*]	His	Arg	Pro	TAA	总 EAA	
1	2.39 $\pm$ 0.02	1.89 $\pm$ 0.03	1.35 $\pm$ 0.01	1.61 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.01	1.39 $\pm$ 0.01	2.97 $\pm$ 0.04	37.32 $\pm$ 0.34 ^{gh}	12.74 $\pm$ 0.09 ^f	
2	2.66 $\pm$ 0.02	2.09 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.08	1.82 $\pm$ 0	0.99 $\pm$ 0.01	2.71 $\pm$ 0.03	39.53 $\pm$ 0.15 ^{cde}	13.75 $\pm$ 0.06 ^d	2.05 $\pm$ 0.02	
3	3.34 $\pm$ 0.02	2.64 $\pm$ 0.03	1.92 $\pm$ 0.01	2.45 $\pm$ 0.02	1.22 $\pm$ 0.01	52.52 $\pm$ 0.33 ^a	18.27 $\pm$ 0.11 ^a	1.51 $\pm$ 0	2.58 $\pm$ 0.17	
4	2.45 $\pm$ 0.02	1.93 $\pm$ 0.03	1.40 $\pm$ 0.06	1.90 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.02	12.79 $\pm$ 0.13 ^f	1.50 $\pm$ 0.01	3.02 $\pm$ 0.06	41.44 $\pm$ 0.48 ^{cd}	
5	2.65 $\pm$ 0.02	2.09 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.01	1.68 $\pm$ 0.01	1.02 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.02	2.84 $\pm$ 0.03	37.74 $\pm$ 0.36 ^{efg}	13.22 $\pm$ 0.10 ^e	
6	2.46 $\pm$ 0.02	1.80 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.06	1.84 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.01	2.45 $\pm$ 0.08	35.58 $\pm$ 0.76 ^{hi}	12.43 $\pm$ 0.19 ^f	1.52 $\pm$ 0.02	
7	2.43 $\pm$ 0.04	1.92 $\pm$ 0.04	1.40 $\pm$ 0.04	1.67 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.02	38.57 $\pm$ 1.88 ^{def}	13.32 $\pm$ 0.56 ^c	1.54 $\pm$ 0.01	2.70 $\pm$ 0.01	
8	2.51 $\pm$ 0.09	1.99 $\pm$ 0.12	1.45 $\pm$ 0.05	1.78 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.05	13.39 $\pm$ 0.10 ^e	1.57 $\pm$ 0.01	2.92 $\pm$ 0.04	40.89 $\pm$ 0.47 ^c	
9	2.57 $\pm$ 0.01	2.06 $\pm$ 0.02	1.43 $\pm$ 0.07	1.80 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0	1.18 $\pm$ 0.03	2.52 $\pm$ 0.03	35.24 $\pm$ 0.41 ⁱ	12.08 $\pm$ 0.15 ^g	
10	2.65 $\pm$ 0.03	2.13 $\pm$ 0.02	1.49 $\pm$ 0.01	1.80 $\pm$ 0.01	1.05 $\pm$ 0.01	3.41 $\pm$ 0.02	47.05 $\pm$ 0.32 ^b	16.07 $\pm$ 0.14 ^b	1.39 $\pm$ 0.01	
11	2.28 $\pm$ 0.03	1.86 $\pm$ 0.03	1.27 $\pm$ 0.01	1.50 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.01	37.32 $\pm$ 0.34 ^{gh}	12.74 $\pm$ 0.09 ^f	1.51 $\pm$ 0.01	2.71 $\pm$ 0.03	
12	3.05 $\pm$ 0.02	2.51 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.07	2.04 $\pm$ 0.01	1.16 $\pm$ 0.01	13.75 $\pm$ 0.06 ^d	2.05 $\pm$ 0.02	3.92 $\pm$ 0.02	52.52 $\pm$ 0.33 ^a	

注: *表示 EAA。

4 基于灰色关联度法的不同产地药用蚂蚁质量比较

4.1 样品数据集的建立

通过测定12批药用蚂蚁样品的5类主要药效成分微量元素(Ⅰ)、浸出物(Ⅱ)、总氮(Ⅲ)、蚁酸(Ⅳ);TAA(Ⅴ)的含量,建立药用蚂蚁质量评价灰色模式识别的数据集,见表6。

表6 12批药用蚂蚁5类主要药效成分的质量分数

编号	Ⅰ/mg·kg ⁻¹	Ⅱ/%	Ⅲ/%	Ⅳ/mg·g ⁻¹	Ⅴ/%
1	2 101.505	20.226	7.506	56.487	37.324
2	1 226.656	14.160	8.222	56.751	39.532
3	965.801	27.296	10.119	43.078	52.518
4	786.890	14.881	7.237	55.226	36.485
5	1 330.877	17.699	8.081	9.931	41.442
6	1 190.277	33.911	7.655	114.011	37.742
7	1 399.810	17.062	7.267	75.914	35.576
8	860.392	29.203	8.034	103.292	38.569
9	888.058	25.398	7.863	105.123	38.747
10	870.970	26.949	8.149	108.420	40.891
11	1 095.748	21.663	8.197	55.341	35.242
12	1 019.293	17.684	9.741	9.681	47.051

4.2 灰色关联模型的建立

4.2.1 参考序列的选择 设有 n 个研究样品,每个样品有 m 项评价指标,组成评价单元序列 $\{X_{ik}\}$ ($i=1, 2, 3, \dots, n; k=1, 2, 3, \dots, m$; 本研究中 $n=12, m=5$)。设最优参考序列的各项指标是 n 个蚂蚁样品对应指标的最大值,记作 $\{X_{sk}\}=\max(1 \leq i \leq n)\{X_{ik}\}$;最差参考序列的各项指标是 n 个蚂蚁样品对应指标的最小值,记作 $\{X_{tk}\}=\min(1 \leq i \leq n)\{X_{ik}\}$ 。

4.2.2 关联系数与关联度计算 首先对原始数据进行均值化处理^[14]。按照公式(1)、公式(2)分别计算出各评价单元相对最优、最差序列的关联系数,按照公式(3)、公式(4)分别计算出各评价单元相对最优、最差序列的关联度,结果见表7、表8。

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

$$\xi_{k(t)}^i = \frac{\Delta'_{\min} + \rho \Delta'_{\max}}{|Y_{ik} - Y_{tk}| + \rho \Delta'_{\max}} \quad (2)$$

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

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

公式(1)与公式(2)中, $\Delta_{\min} = \min|Y_{ik} - Y_{sk}|$,

$\Delta_{\max} = \max|Y_{ik} - Y_{sk}|$; $\Delta'_{\min} = \min|Y_{ik} - Y_{tk}|$, $\Delta'_{\max} = \max|Y_{ik} - Y_{tk}|$; ρ 为分辨系数,一般取0.5即可满足分辨率要求^[15]。

表7 评价单元相对于最优参考序列的关联系数与关联度

编号	$\xi_{k(s)}^i$					$r_{i(s)}$
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	
1	1.000	0.419	0.355	0.476	0.362	0.523
2	0.429	0.333	0.432	0.477	0.399	0.414
3	0.367	0.599	1.000	0.424	1.000	0.678
4	0.333	0.342	0.333	0.470	0.350	0.366
5	0.460	0.379	0.414	0.334	0.438	0.405
6	0.419	1.000	0.369	1.000	0.369	0.631
7	0.484	0.370	0.336	0.578	0.338	0.421
8	0.346	0.677	0.409	0.830	0.382	0.529
9	0.351	0.537	0.390	0.854	0.385	0.504
10	0.348	0.587	0.422	0.903	0.426	0.537
11	0.395	0.446	0.429	0.471	0.333	0.415
12	0.378	0.378	0.792	0.333	0.612	0.499

表8 评价单元相对于最差参考序列的关联系数与关联度

编号	$\xi_{k(t)}^i$					$r_{i(t)}$
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	
1	0.333	0.619	0.843	0.527	0.806	0.626
2	0.599	1.000	0.594	0.526	0.668	0.677
3	0.786	0.429	0.333	0.610	0.333	0.498
4	1.000	0.932	1.000	0.534	0.874	0.868
5	0.547	0.736	0.631	0.995	0.582	0.698
6	0.620	0.333	0.775	0.333	0.776	0.567
7	0.517	0.773	0.980	0.441	0.963	0.735
8	0.899	0.396	0.644	0.358	0.722	0.604
9	0.867	0.468	0.697	0.353	0.711	0.619
10	0.887	0.436	0.613	0.346	0.605	0.577
11	0.680	0.568	0.600	0.533	1.000	0.676
12	0.739	0.737	0.365	1.000	0.422	0.653

4.2.3 相对关联度(r_i)计算与相关性分析 灰色关联模型最理想的结果是各评价单元与最优参考序列关联程度最大而同时与最差参考序列关联程度最小,由此按照公式(5)计算 r_i 。显然, $r_{i(s)}$ 越大,评价单元序列与最优参考序列的关联程度越大,评价单元越佳。 $r_{i(t)}$ 意义相反,其值越小,评价单元越佳。按照公式(5)计算出12批药用蚂蚁样品 r_i 依次为0.455、0.379、0.576、0.296、0.367、0.527、0.364、0.467、0.449、0.482、0.380、0.433。

$$r_i = \frac{r_{i(s)}}{r_{i(s)} + r_{i(t)}} \quad (i=1, 2, \dots, n, n \leq 12) \quad (5)$$

12批药用蚂蚁样品的 r_i 为0.296~0.576,其中有

2个产地样品的 $r_i > 0.500$, 有4个产地样品的 r_i 为0.400~0.500。综合分析药用蚂蚁 r_i 发现, 3号贵州凯里市产区的叶形多刺蚁样品、6号江西上高县产区的双齿多刺蚁样品、10号广西博白县产区的双齿多刺蚁样品的 r_i 分别为0.576、0.527、0.482, 居前3位, 表明其药材质量相对较优。由表9可知, 5类主要药效成分中, 浸出物含量与 r_i 呈显著正相关($P < 0.01$), 其他成分与 r_i 相关性不显著。说明浸出物含量是评价药用蚂蚁药材质量的主要指标, 这一结论与企业生产上评价蚂蚁药材质量过程中首先对浸出物含量及色度进行控制的做法相吻合。

表9 12批药用蚂蚁样品各成分含量与 r_i 的相关性分析

指标	I	II	III	IV	V	r_i
I	1.000					
II	-0.240	1.000				
III	-0.280	0.122	1.000			
IV	-0.226	0.667*	0.462	1.000		
V	-0.236	0.141	0.927**	-0.431	1.000	
r_i	-0.033	0.819**	0.517	0.340	0.569	1.000

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

5 讨论

本研究参考《中国药典》2020年版通则对12批药用蚂蚁样品进行杂质、水分与灰分检测, 发现其含量高低与各地习用的采收时间及加工方式有关。贵州、江西两地常用烫死法处理蚂蚁, 广东、广西地区则习用闷死法。本研究发现江西产区的蚂蚁杂质质量分数最低, 仅1.44%, 可见江西蚂蚁药材净度最高。同时, 其含水量(3.99%)也最高。据了解, 江西地区习惯于当年11月至次年1月采挖野生蚂蚁巢, 将活蚁从巢中抖落后置于热铁锅内烫死, 推测含水量高是因为高温快速致死使蚂蚁尽可能地保留了体内水分。秋冬季节采收, 避开蚂蚁繁殖高峰期, 故样品中蚂蚁卵及蛹的占比较小; 活蚁从蚁巢震落, 能够有效减少杂质附着, 因此江西蚂蚁药材净度最高。广东、广西习惯采挖蚁巢后将蚁巢整个置于塑料袋中, 密封1~2 d, 闷死蚂蚁(窒息死亡使得蚂蚁体内水分慢慢流失)后晒干, 此时外力将蚂蚁从巢中抖落更易黏附杂质。叶形多刺蚁与双齿多刺蚁相比, 蚁体不容易碎裂, 药材完整度较高, 但5号叶形多刺蚁样品中因含有较多植物种子类杂质导致该样品杂质质量过高, 猜测此类果实应当是叶

形多刺蚁食物或营巢材料, 广布于其适生环境中。双齿多刺蚁蚁体极易碎裂, 药材完整度不高, 且样品中往往含有较多藤本类植物的茎叶, 砂砾、碎石占比较大。

本研究发现12批药用蚂蚁蚁酸质量分数为9.68~114.01 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 差异幅度较大, 2种药用蚂蚁蚁酸含量种间差异具有统计学意义。就叶形多刺蚁来看, 5号镇远县样品显著低于瓮安县与凯里市样品, 推测差异原因有2点: 一是该批叶形多刺蚁肢体表面有较多的杂质、尘土附着物; 二是叶形多刺蚁营暂时性社会寄生, 通常与弓背蚁属(*Camponotus*)蚂蚁或绿蝇等其他亲蚁物种形成混合群体^[16-17], 该批样品内可能混入了肉眼不易识别的亲蚁物种。就双齿多刺蚁来看, 12号广西田林县双齿多刺蚁样品蚁酸质量分数不足10 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 显著低于其他产区的双齿多刺蚁样品, 推测差异源于采收期与加工方式的不同。12号样品采收期为每年的3—6月, 市场上称为“春蚁”, 样品中含有较多带翅雄蚁与带翅雌蚁; 同样11号广西田林县双齿多刺蚁样品采收期为每年的12月至次年2月, 市场上称为“冬蚁”, 带翅雄蚁与带翅雌蚁数量较少, 以无翅工蚁为主。可见采收期不同, 对双齿多刺蚁中蚁酸含量的高低产生了很大影响。12号样品与2、4、7号双齿多刺蚁样品相比又存在加工方式的差异。有关不同采收期与加工方式对双齿多刺蚁蚁酸含量的影响需深入研究。

本研究通过测定不同基原与产地药用蚂蚁的5类主要药效成分发现, 12批药用蚂蚁样品不同指标成分含量没有表现出明显的规律性, 因此如果仅从某单一成分出发很难综合评价不同基原与产地蚂蚁药材的质量。本研究通过建立灰色关联度模型对药用蚂蚁质量进行综合评价, 发现双齿多刺蚁的评价结果与实际应用效果拟合度较高。基于现有研究结果, 3号贵州凯里市产区的叶形多刺蚁样品具有最高的 r_i , 说明该产区的叶形多刺蚁或具有与双齿多刺蚁等同的药用价值, 值得进一步探索。这对缓解双齿多刺蚁野生资源应用压力具有重要意义。此外, 本研究结果显示双齿多刺蚁的质量评价结果与企业实际应用情况拟合度较高, 说明GRA在药用蚂蚁质量评价研究方面具备一定的合理性与应用价值^[18], 为药用蚂蚁药材的质量评价提供了参考。

参考文献

- [1] HÖLLDOBLER B, WILSON E O. The Ants [M]. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1990: 26.
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 2283-2284.
- [3] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963: 455-456.
- [4] 王常禄, 吴坚. 中国多刺蚁属(膜翅目: 蚁科)昆虫研究[J]. 林业科学研究, 1991, 4(6): 596-601.
- [5] 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.
- [6] 李峰, 张振秋, 李可强, 等. 基于灰色关联分析的全蝎、蜈蚣药材商品质量评价研究[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2118-2120.
- [7] 李峰, 张振秋, 刘威, 等. 灰关联度模型的地龙商品药材质量评价研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(9): 1930-1932.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 114-236.
- [9] 游思亮, 王青. 利用全自动凯氏定氮仪测定大豆粗蛋白含量的条件研究[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(14): 213-215, 254.
- [10] 邹耀华, 殷红妹, 刘宇文. 衍生色谱法测定蚂蚁中蚁酸含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(8): 1880-1881.
- [11] 张晓萍, 张文, 戚鹏飞, 等. 海藻及其混伪品中17种氨基酸的含量测定[J]. 中国药房, 2020, 31(4): 468-472.
- [12] 中国药学会药学史专业委员会. 江苏省中药材标准[M]. 北京: 中国药学会, 2017: 2.
- [13] 张柯瑶, 郭惠, 王媚, 等. 扶正固本类中药中微量元素含量测定及药效关系研究[J]. 陕西中医, 2017, 38(3): 398-400.
- [14] 刘月露. 蟾酥商品药材品质评价研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2017.
- [15] 王斌, 林钦贤, 梁伟龙, 等. 灰色关联度分析法评价半枝莲药材质量[J]. 中医药信息, 2021, 38(5): 6-10.
- [16] IWAI H, HORIKAWA D D, ARAKAWA K, et al. Rearing and observation of immature stages of the hoverfly *Microdon katsuurai* (Diptera, Syrphidae) [J]. Biodivers Data J, 2016(4): e10185.
- [17] IWAI H, KURIHARA Y, KONO N, et al. The evidence of temporary social parasitism by *Polyrhachis lamellidens* (Hymenoptera, Formicidae) in a camponotus obscuripes colony (Hymenoptera, Formicidae) [J]. Insect Soc, 2021, 68(4): 375-382.
- [18] 李峰, 张振秋. 动物药材品质评价体系的构建[J]. 中药材, 2011, 34(11): 1653-1656.

(收稿日期: 2022-03-10 编辑: 田苗)