

基于 HPLC 特征图谱结合化学计量学的菊花特征标志物的研究

张伟^{1,2,3}, 吴瑞¹, 常相伟¹,
赵宏苏¹, 张玖捌², 金传山^{1,3}, 吴德玲^{1,3*}, 陆兔林^{2*}

¹安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; ²南京中医药大学药学院, 南京 210023;

³中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 合肥 230012

摘要:本研究采用 HPLC 建立不同品种菊花的特征图谱, 并结合特征图谱相似度评价、聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminate analysis, OPLS-DA) 对 5 个不同品种菊花共有成分与差异性成分进行研究。从亳菊、滁菊、贡菊、杭菊、怀菊特征图谱中分别标定了 21、20、25、22、22 个共有峰, 从菊花对照图谱中标定了 17 个共有峰, 并指出其中 12 个化学成分。五种菊花各自的相似度均在 0.971 以上, 但是种间相似度较低。CA、PCA 及 OPLS-DA 均可将 5 种菊花较为准确地分为 5 类, 结合 OPLS-DA 表明, 异绿原酸 B、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸、香叶木素、隐绿原酸、绿原酸、新绿原酸、木犀草素、香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷等 10 个菊花共有成分可能是菊花的特征标志物, 而芹菜素、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 C 等 7 个成分可能是导致不同品种菊花差异的特征标志物。菊花的 HPLC 特征图谱结合化学计量学方法筛选出菊花的共有的物质基础作为菊花的特征标志物和不同品种菊花之间显著性差异的特征标志物, 可以为菊花的整体质量评价、品种鉴别及单品种特征性评价提供科学依据。

关键词:菊花; 特征图谱; 化学计量学; 特征标志物; 品种鉴别; 质量评价

中图分类号: R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)8-1289-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.8.003

Study on the feature markers of Chrysanthemi Flos based on HPLC fingerprint combined with chemometrics

ZHANG Wei^{1,2,3}, WU Rui¹, CHANG Xiang-wei¹,
ZHAO Hong-su¹, ZHANG Jiu-ba², JIN Chuan-shan^{1,3}, WU De-ling^{1,3*}, LU Tu-lin^{2*}

¹College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

²College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

³Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Hefei 230012, China

Abstract: In this study, HPLC was used to establish the characteristic chromatograms of different medicinal Chrysanthemi Flos species. The similarity evaluation of characteristic chromatograms, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) were combined, which was used to study the common components and differential components of 5 different Chrysanthemi Flos cultivars. 21, 20, 25, 22 and 22 characteristic peaks were determined from the characteristic chromatograms of *Chrysanthemum morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Boju' cv. nov. (BJ), *C. morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Chuju' cv. nov. (CJ), *C. morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Gongju' cv. nov. (GJ), *C. morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Hangju' cv. nov. (HAJ) and *C. morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Huajiu' cv. nov. (HUI) respectively, 17 characteristic peaks were determined from the characteristic chromatogram of Chrysanthemi Flos, and 12 chemical components were identified. The similarity of the five species was above 0.971, but the interspecific similarity was low.

收稿日期: 2022-03-07 接受日期: 2022-06-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973485); 国家重点研发计划 (2018YFC1707004); 安徽高校自然科学研究重点项目 (KJ2020A0390, KJ2020A0889)

* 通信作者 E-mail: dlwu7375@ahcm.edu.cn, ltl2021@njucm.edu.cn

CA, PCA and OPLS-DA could accurately classify the five *Chrysanthemi Flos* species into five categories. Combined with OPLS-DA, Isochlorogenic acid B, 3, 5-*O*-dicoffeoyl quinic acid, diosmetin, cryptochlorogenic acid, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, luteolin, geranitin-7-*O*- β -D-glucoside and other 10 common components in *Chrysanthemi Flos* may be the feature markers of *Chrysanthemi Flos*. Apigenin, apigenin-7-*O*- β -D-glucoside, luteolin-7-*O*-glucoside and isochlorogenic acid C may be the feature markers that lead to the difference of *Chrysanthemi Flos* cultivars. HPLC characteristic chromatograms of *Chrysanthemi Flos* combined with chemometrics were used to screen out the common substance basis of medicinal *Chrysanthemi Flos* as feature markers and feature markers of significant differences among different varieties of *Chrysanthemi Flos*, which could provide scientific basis for overall quality evaluation, variety identification and single variety characteristic evaluation of *Chrysanthemi Flos*.

Key words: *Chrysanthemi Flos*; characteristic chromatogram; chemometrics; feature marker; species identification; quality evaluation

菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 主要含有黄酮类、挥发油、有机酸和微量元素等活性部位^[1], 具有散风清热、平肝明目及清热解毒的功效。《中国药典》2020 版按产地和加工方法的不同, 收录的菊花品种有“亳菊”、“滁菊”、“贡菊”、“杭菊”和“怀菊”^[2]。作为一种药食同源的中药材, 菊花具有品种繁多、成分组成复杂的特点, 而不同品种的菊花因其生长环境、栽培加工方法等不同, 化学成分含量存在很大的差异, 且质量参差不齐, 导致其临床疗效也有所不同^[3-5]。目前, 《中国药典》2020 版以绿原酸、木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷及 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 3 种化学成分含量为评价指标, 难以全面地评价菊花药材的质量^[6]。

中药特征图谱可以表征中药内在质量的整体变化, 越来越多的中药通过建立特征指纹图谱进行质量控制^[7-11], 其中 HPLC 特征指纹图谱技术也常用于菊花的品种鉴别和质量控制研究中^[12-17]。中药质量标志物(Q-Marker)由专属的、与临床疗效相关的、可被监测的化学成分组成, 与中药功能属性等相关, 能反映中药安全性和有效性, 可被用于构建现代中药整体、系统、量化的质量评价体系^[18]。在 Q-Marker 的基础上, 通过整合指纹图谱和化学计量学方法, 发现体现药材或者复方中共性特征的成分, 建立符合中药特点的多维质量评价体系, 可能对中药的科学监管将提供更好的解决方案。

本研究在菊花前期研究的基础上, 通过建立不同品种菊花的 HPLC 特征图谱, 结合化学计量学方法筛选出菊花的共有的物质基础作为菊花的特征标志物, 同时筛选出不同品种菊花之间显著性差异的特征标志物^[19], 从而为菊花的整体质量评价、品种鉴别及单品种特征性评价提供科学依据。

1 实验材料

1.1 仪器

Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 岛津 LC-2030C 3D 高效液相色谱仪; SPD-20AV 检测器(日本岛津公司); KQ-400KDE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 800C 玖蓝多功能粉碎机(永康市玖蓝五金制品有限公司); SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); 电子分析天平(AB135-S, METTLER TOLEDO); BS-300 + 电子天平(上海友声衡器有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸(批号: MUST-21030304)、隐绿原酸(批号: MUST-21042003)、新绿原酸(批号: MUST-21030108)、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号: MUST-21011110)、异绿原酸 B(批号: MUST-21030602)、异绿原酸 C(批号: MUST-21030603) 购于成都曼思特生物科技有限公司; 咖啡酸(批号: DST191030-013, 成都德思特生物技术有限公司); 芹菜素(批号: PS010177)、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号: PS011186)、木犀草素(批号: PS010346)、木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号: PS000708)、金合欢素(批号: PS011043)、香叶木素(批号: PS010395)、香叶木素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号: PS011578) 均购于成都普思生物科技股份有限公司, 纯度均大于 98.0%。甲醇、乙腈(瑞典 OCEANPAK 欧普森公司, 色谱纯); 冰醋酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 分析纯); 超纯水。

1.3 样品

50 批菊花样品分别采收于安徽亳州、安徽滁州、安徽黄山、浙江桐乡、河南焦作, 经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为菊科植物亳菊 *Chrysanthemum morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Boju' cv. nov. (BJ)、滁

菊 *Chrysanthemum morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Chuju' cv. nov. (CJ)、贡菊 *Chrysanthemum morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Gongju' cv. nov. (GJ)、杭菊 *Chrysanthemum morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Hangju' cv.

nov. (HAJ)、怀菊 *Chrysanthemum morifolium* (Ramat). Tzvel. 'Huaiju' cv. nov. (HUJ) 的干燥头状花序。样品粉碎,过一号筛,备用。来源信息见表 1。

表 1 50 批菊花样品来源

Table 1 Sources of 50 batches of *Chrysanthemi Flos*

批次 Batch	编号 Number	品种 Variety	来源 Source
S1	BJ-01	<i>Chrysanthemum morifolium</i> (Ramat). Tzvel. 'Boju' cv. nov.	安徽亳州
S2	BJ-02		安徽亳州
S3	BJ-03		安徽亳州
S4	BJ-04		安徽亳州
S5	BJ-05		安徽亳州
S6	BJ-06		安徽亳州
S7	BJ-07		安徽亳州
S8	BJ-08		安徽亳州
S9	BJ-09		安徽亳州
S10	BJ-10		安徽亳州
S11	CJ-01	<i>Chrysanthemum morifolium</i> (Ramat). Tzvel. 'Chuju' cv. nov.	安徽滁州
S12	CJ-02		安徽滁州
S13	CJ-03		安徽滁州
S14	CJ-04		安徽滁州
S15	CJ-05		安徽滁州
S16	CJ-06		安徽滁州
S17	CJ-07		安徽滁州
S18	CJ-08		安徽滁州
S19	CJ-09		安徽滁州
S20	CJ-10		安徽滁州
S21	GJ-01	<i>Chrysanthemum morifolium</i> (Ramat). Tzvel. 'Gongju' cv. nov.	安徽黄山
S22	GJ-02		安徽黄山
S23	GJ-03		安徽黄山
S24	GJ-04		安徽黄山
S25	GJ-05		安徽黄山
S26	GJ-06		安徽黄山
S27	GJ-07		安徽黄山
S28	GJ-08		安徽黄山
S29	GJ-09		安徽黄山
S30	GJ-10		安徽黄山
S31	HAI-01	<i>Chrysanthemum morifolium</i> (Ramat). Tzvel. 'Hangju' cv. nov.	浙江桐乡
S32	HAI-02		浙江桐乡

续表 1 (Continued Tab. 1)

批次 Batch	编号 Number	品种 Variety	来源 Source
S33	HAI-03		浙江桐乡
S34	HAI-04		浙江桐乡
S35	HAI-05		浙江桐乡
S36	HAI-06		浙江桐乡
S37	HAI-07		浙江桐乡
S38	HAI-08		浙江桐乡
S39	HAI-09		浙江桐乡
S40	HAI-10		浙江桐乡
S41	HUI-01	怀菊 <i>Chrysanthemum morifolium</i> (Ramat). Tzvel. 'Huaiju' cv. nov.	河南焦作
S42	HUI-02		河南焦作
S43	HUI-03		河南焦作
S44	HUI-04		河南焦作
S45	HUI-05		河南焦作
S46	HUI-06		河南焦作
S47	HUI-07		河南焦作
S48	HUI-08		河南焦作
S49	HUI-09		河南焦作
S50	HUI-10		河南焦作

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 醋酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~8 min, 5% → 10% A; 8~15 min, 10% → 14% A; 15~18 min, 14% → 17% A; 18~22 min, 17% → 17.5% A; 22~35 min, 17.5% → 18% A; 35~40 min, 18% A; 40~50 min, 18% → 19% A; 50~65 min, 19% → 30% A; 65~80 min, 30% → 52% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 348 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取菊花样品粉末(过一号筛)约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 300 W, 频率 45 Hz) 40 min, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足失重, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 混合对照品溶液的制备

取绿原酸、木犀草素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异

绿原酸 B、异绿原酸 C、芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、香叶木素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、木犀草素与金合欢素对照品适量, 置棕色量瓶中, 加 70% 甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 31.2 μg、木犀草素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 23.6 μg、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 86.3 μg、新绿原酸 20.9 μg、隐绿原酸 22.1 μg、咖啡酸 41.5 μg、异绿原酸 B 22.7 μg、异绿原酸 C 37.8 μg、芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 59.2 μg、香叶木素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 46.7 μg、香叶木素 69.3 μg、芹菜素 58.4 μg、木犀草素 52.1 μg 与金合欢素 54.7 μg 的混合溶液, 即得。混合对照品色谱图见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

精密称取怀菊样品(S41)0.25 g, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, “2.1”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录特征图谱, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间 RSD 值($n = 6$)为 0.04% ~ 0.18%, 相对峰面积 RSD 值($n = 6$)为 0.01% ~ 1.29%, 表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验

精密称取同一批次怀菊样品(S41) 0.25 g, 6份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项下色谱条件测定,记录特征图谱,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间 RSD 值($n = 6$)为 0.06% ~ 0.25%,各共有峰(除 18 号峰的 RSD 为 5.36%)相对峰面积 RSD 值($n = 6$)为 1.24% ~ 4.52%,表明该方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于制备完成后 0、2、4、8、12、24 h 以“2.1”项下色谱条件测定,记录特征图谱,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间 RSD 值($n = 6$)为 0.02% ~ 0.25%,相对峰面积 RSD 值($n = 6$)为 0.10% ~ 1.19%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 不同品种菊花特征图谱的建立及分析

2.5.1 五种菊花特征图谱的建立

分别精密称取 50 批不同品种菊花样品 0.25 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。将 10 批亳菊药材的 HPLC 色谱图以 AIA 文件格式依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)”软件,以 S3 为参照图谱,多点校正法进行匹配,以中位数法生成亳菊对照图谱(R)。滁菊、贡菊、杭菊、怀菊的对照图谱建立同亳菊。将 50 批菊花药材的 HPLC 色谱图依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)”软件,生成菊花对照图谱(R)。样品叠加图谱见图 2,对照图谱见图 3。

2.5.2 特征峰的确证

通过分析确定 10 批亳菊、滁菊、贡菊、杭菊、怀菊的共有峰分别为 21、20、25、22、22 个;50 批菊花

样品共有峰有 17 个。经与混合对照品色谱峰比对,亳菊确认其中 14 个主要特征峰;滁菊确认其中 14 个主要特征峰;贡菊确认其中 12 个主要特征峰;杭菊确认其中 13 个主要特征峰;怀菊确认其中 13 个主要特征峰;50 批菊花样品确认其中 12 个共有峰,分别为新绿原酸(1 号峰)、绿原酸(3 号峰)、隐绿原酸(4 号峰)、木犀草素-7- O - β -D-葡萄糖苷(12 号峰)、异绿原酸 B(13 号峰)、3,5- O -二咖啡酰基奎宁酸(15 号峰)、芹菜素-7- O - β -D-葡萄糖苷(18 号峰)、异绿原酸 C(19 号峰)、香叶木素-7- O - β -D-葡萄糖苷(21 号峰)、香叶木素(26 号峰)、芹菜素(28 号峰)、木犀草素(29 号峰)。在 50 批菊花药材特征图谱中,3 号峰的分度大、对称性良好、峰面积较大且为所有样品共有,因此选取 3 号峰(绿原酸)作为参照峰 S,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

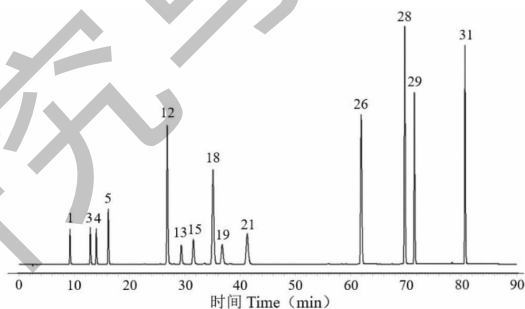


图 1 混合对照品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed reference substance

注:1. 新绿原酸;3. 绿原酸;4. 隐绿原酸;5. 咖啡酸;12. 木犀草素-7- O - β -D-葡萄糖苷;13. 异绿原酸 B;15. 3,5- O -二咖啡酰基奎宁酸;18. 芹菜素-7- O - β -D-葡萄糖苷;19. 异绿原酸 C;21. 香叶木素-7- O - β -D-葡萄糖苷;26. 香叶木素;28. 芹菜素;29. 木犀草素;31. 金合欢素。Note:1. Neochlorogenic acid;3. Chlorogenic acid;4. Cryptochlorogenic acid;5. Caffeic acid;12. Luteolin-7- O - β -D-glucoside;13. Isochlorogenic acid B;15. 3,5- O -dicaffeoyl quinic acid;18. Apigenin-7- O - β -D-glucoside;19. Isochlorogenic acid C;21. Geranitin-7- O - β -D-glucoside;26. Diosmetin;28. Apigenin;29. Luteolin;31. Acacetin.

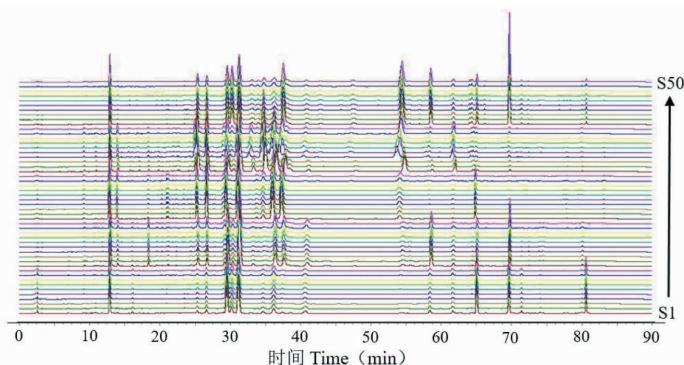


图 2 50 批菊花样品 HPLC 叠加色谱图

Fig. 2 HPLC overlay chromatogram of 50 batches of Chrysanthemi Flos

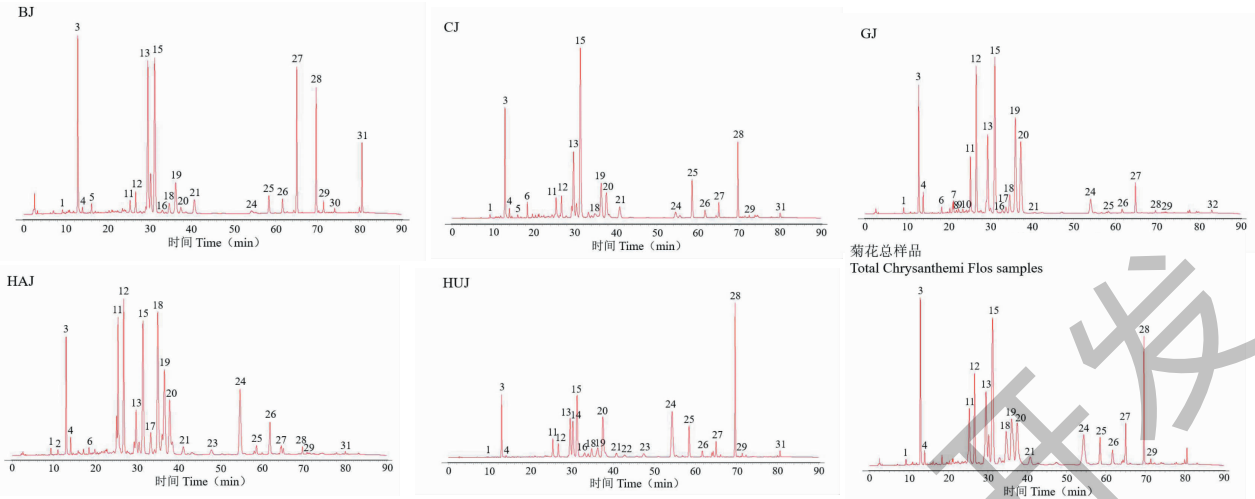


图3 不同品种菊花对照图谱及菊花总样品对照图谱

Fig. 3 Control characteristic chromatograms of different species of Chrysanthemi Flos and total Chrysanthemi Flos samples

2.5.3 似度评价

将亳菊、滁菊、贡菊、杭菊、怀菊药材的图谱数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版本)”软件,生成相对应的对照图谱,计算各色谱图组内的相似度,结果显示,亳菊之间的相似度为0.992~1.000;滁菊之间的相似度为0.996~1.000;贡菊之间的相似度为0.995~1.000;杭菊之间的相似度为0.971~0.989;怀菊之

间的相似度为0.999~1.000,说明同一品种菊花之间差异不大。再将50批菊花药材的图谱数据依次导入该软件,进行组间相似度分析,结果见表2,结果显示种间相似度在0.391~0.690范围内,说明不同品种菊花之间的差异较大。50批菊花药材的17个共有峰相对保留时间的RSD值均小于0.80%,但相对峰面积差异较大,RSD值为1.39%~58.87%。

表2 50批菊花样品的相似度分析

Table 2 Similarity analysis of 50 batches of Chrysanthemi Flos

批次 Batch	相似度 Similarity	批次 Batch	相似度 Similarity
S1	0.572	S26	0.475
S2	0.572	S27	0.524
S3	0.564	S28	0.524
S4	0.554	S29	0.503
S5	0.567	S30	0.418
S6	0.575	S31	0.536
S7	0.573	S32	0.527
S8	0.559	S33	0.523
S9	0.563	S34	0.407
S10	0.569	S35	0.407
S11	0.654	S36	0.407
S12	0.664	S37	0.397
S13	0.672	S38	0.391
S14	0.690	S39	0.407
S15	0.686	S40	0.418
S16	0.675	S41	0.660
S17	0.675	S42	0.660

续表 2 (Continued Tab. 2)

批次 Batch	相似度 Similarity	批次 Batch	相似度 Similarity
S18	0.663	S43	0.660
S19	0.470	S44	0.660
S20	0.666	S45	0.566
S21	0.519	S46	0.546
S22	0.514	S47	0.571
S23	0.447	S48	0.571
S24	0.475	S49	0.570
S25	0.466	S50	0.663

2.5.4 聚类分析(CA)

将 50 批菊花样品中 17 个共有峰的峰面积导入 SPSS 26.0 软件,利用“描述统计”方法标准化后,采

用组间联接法,以平方欧式距离为测度进行系统聚类分析,结果见图 4。50 批菊花样品可被准确地分为 5 类,即五个品种的菊花各自聚为一类。

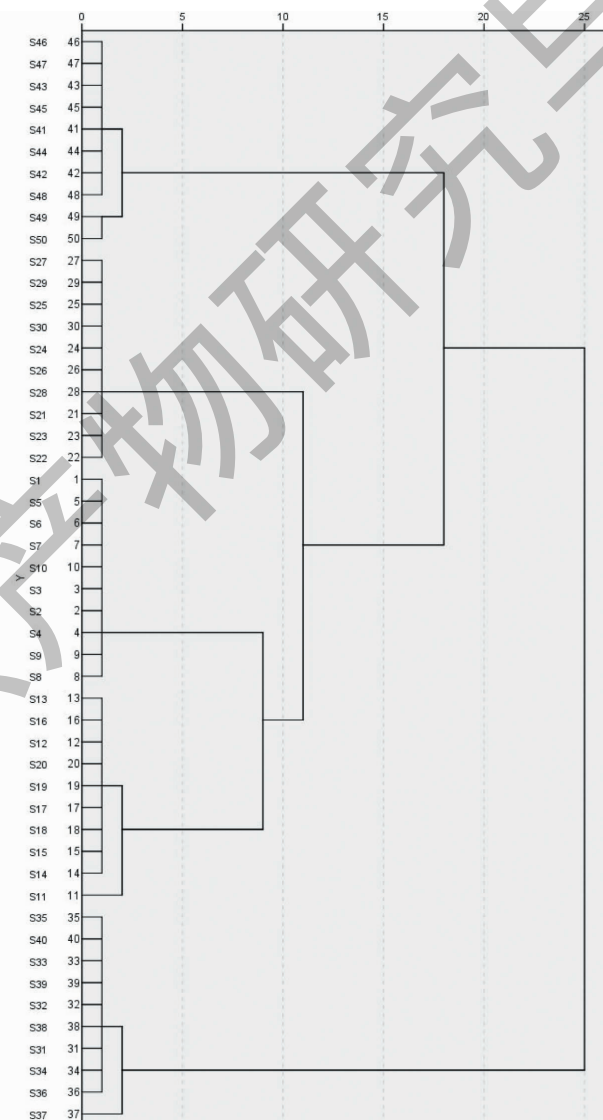


图 4 50 批菊花样品聚类分析图

Fig. 4 Hierarchical clustering analysis of 50 batches of Chrysanthemi Flos

2.5.5 主成分分析(PCA)

以主成分的特征值和累积贡献率为依据,17个共有峰峰面积为变量,采用 SPSS 26.0 软件对 50 批菊花药材进行 PCA 分析,相关系数的特征值和方差贡献率见表 3。将特征值 >1 为提取标准,可提取出 5 个主成分,其累积方差贡献率达 98.955%,可以代表菊花药材特征图谱共有峰的大部分信息。为进一步分析 50 批菊花样品之间的差异,用 SIMCA-P 14.1 软件绘制 50 批菊花样品的主成分得分图,见图 5。5 个不同品种的菊花药材明显地分布于各自的特定区域,其中亳菊、滁菊、怀菊与贡菊、杭菊又明

显分布于左右两个区域。位于长江以南的杭菊、贡菊以茶菊为主,兼顾药用;位于长江以北的亳菊、滁菊和位于河南的怀菊则以药用为主,兼顾茶用^[1]。根据主成分得分图可以看出不同品种菊花之间有一定的相似性,相同品种菊花之间也存在差异性。怀菊样品间离散度较大;贡菊与杭菊偏于茶饮、同位于长江以南而处于图中右区域;亳菊、滁菊、怀菊因偏于药用而同处于左区域,但由于产地不同,所以怀菊与亳菊、滁菊虽聚为一类但内部差异较明显,说明菊花的品质与产地、品种等因素密切相关。

表 3 特征值和方差贡献率

Table 3 Characteristic value and variance contribution rate

主成分 Principal component	特征值 Eigenvalue	方差贡献率 Variance contribution (%)	累积方差贡献率 Cumulative variance contribution (%)
1	7.892	46.425	46.425
2	3.242	19.072	65.497
3	2.818	16.575	82.072
4	1.842	10.838	92.91
5	1.028	6.045	98.955

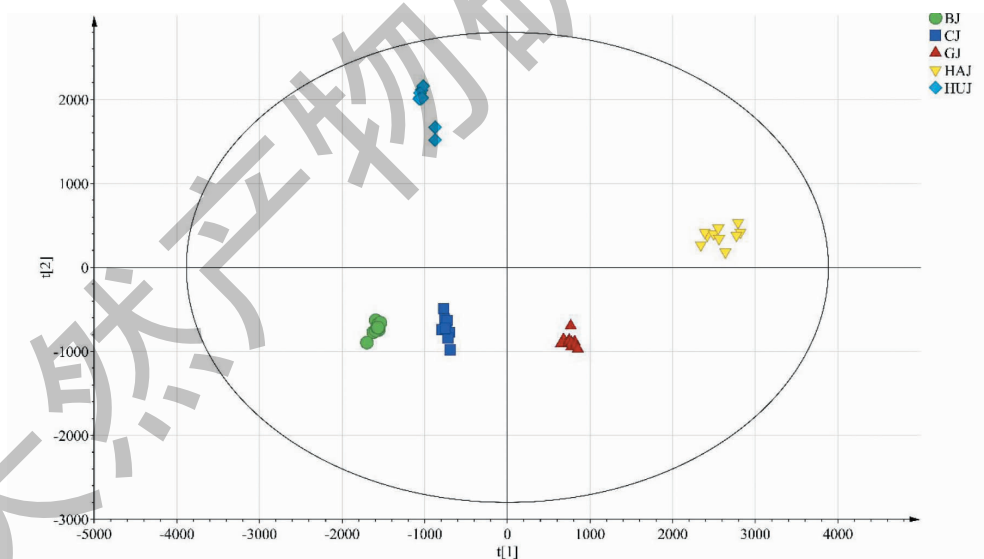


图 5 50 批菊花样品主成分分析得分图

Fig. 5 The PCA score plot of 50 batches of Chrysanthemi Flos

2.5.6 正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)

在主成分分析提取得到的 5 个主成分的基础上,建立监督模式偏最小二乘判别分析模型,进一步寻找不同品种菊花的差异标志物。在建立的偏最小二乘判别分析模型中, R^2X 和 R^2Y 分别为 0.993 和

0.991, Q^2 为 0.989,表明建立的模型预测能力较好。为防止模型出现过拟合,利用 200 次置换检验对模型进行内部验证,检验参数 $R^2 = (0.0, 0.0106)$, $Q^2 = (0.0, -0.384)$,结果见图 6。最右边的 R^2 和 Q^2 值大于 0.9,高于左边的 R^2 和 Q^2 值, Q^2 回归线的截

距为负值,表明模型中不存在过拟合现象,结果可靠。偏最小二乘判别分析得分图见图 7。50 批样品被分成 5 组,5 组之间以左右划分又被分为两大类, I 类包括贡菊、杭菊, II 类包括亳菊、滁菊、怀菊。该结果与聚类分析及主成分分析结果一致,说明不同品种的菊花化学成分存在差异。变量重要性投影值 (VIP) 图见图 8,筛选出贡献率较大的 7 个变量 (VIP > 1),依次为 24、28(芹菜素)、18(芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷)、12(木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷)、19

(异绿原酸 C)、11、20 号峰,说明不同品种菊花的化学成分差异可能是由上述成分引起的,这七个成分可作为不同品种菊花之间差异性的主要特征标志物。13(异绿原酸 B)、25、15(3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸)、27、26(香叶木素)、4(隐绿原酸)、3(绿原酸)、1(新绿原酸)、29(木犀草素)、21(香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷)号峰的 VIP < 1,且为 5 个不同品种菊花所共有,这些成分在判断是否为菊花中起到重要作用,可作为菊花的特征标志物(见表 4)。

表 4 菊花特征标志物
Table 4 Feature markers of Chrysanthemi Flos

样品 Sample	特征共有峰数目/ 指认出的峰数目 Number of feature peaks common/ Number of peaks identified	差异性标志物 Different maker	共有标志物 Common marker
菊花总样品 Total Chrysanthemi Flos	17/12	芹菜素、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、异绿原酸 C、峰 24、峰 11、峰 20	3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸、异绿原酸 B、香叶木素、隐绿原酸、绿原酸、新绿原酸、木犀草素、香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷、峰 25、峰 27
BJ	21/14	芹菜素、咖啡酸、金合欢素、异绿原酸 B	
CJ	20/14	芹菜素、咖啡酸	
GJ	25/12	木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、异绿原酸 C	
HAI	22/13	木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、异绿原酸 C、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷	
HUJ	22/13	芹菜素	

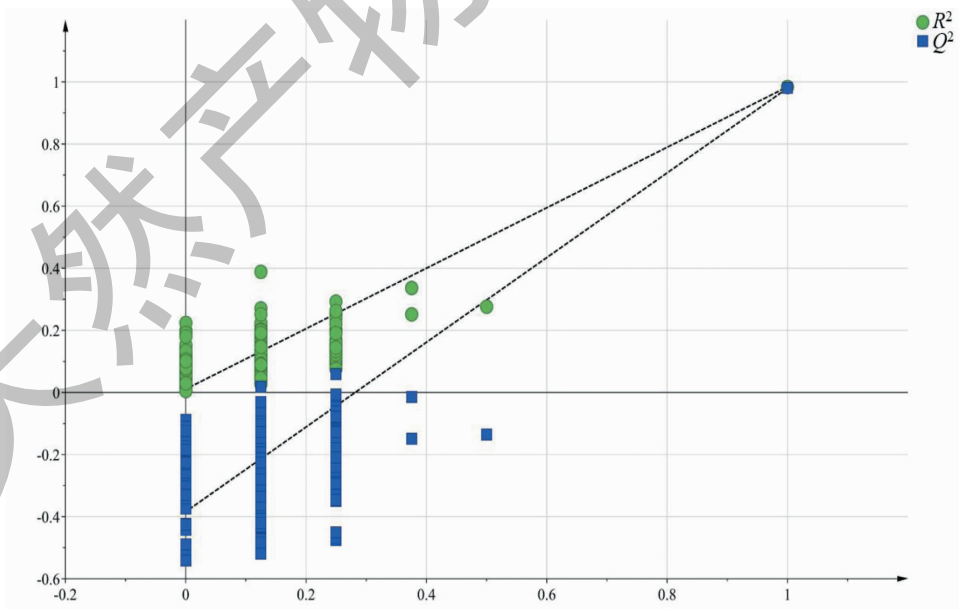


图 6 50 批菊花 PLS-DA 模型置换检验图

Fig. 6 PLS-DA permutation test of 50 batches of Chrysanthemi Flos

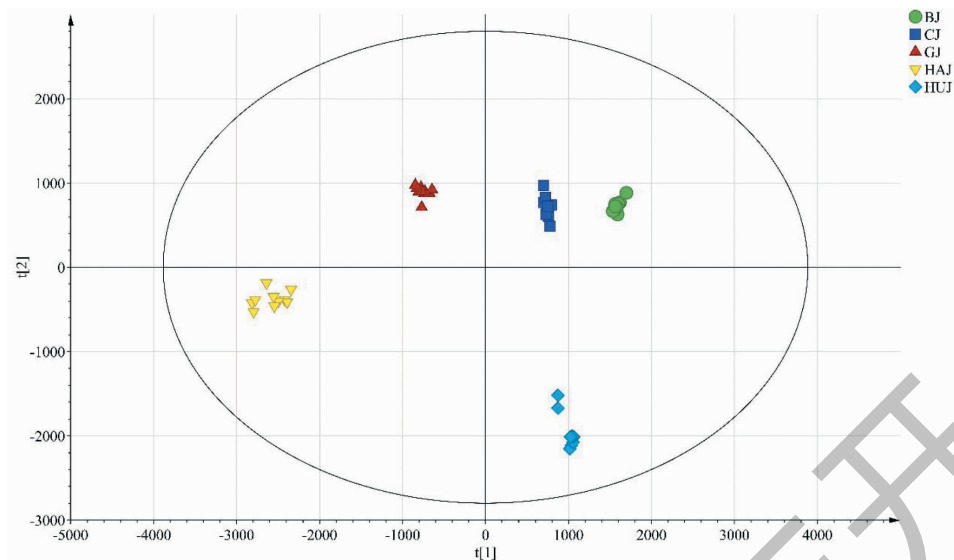


图7 50批菊花样品 PLS-DA 得分分布图

Fig. 7 The PLS-DA score plot of 50 batches of Chrysanthemi Flos

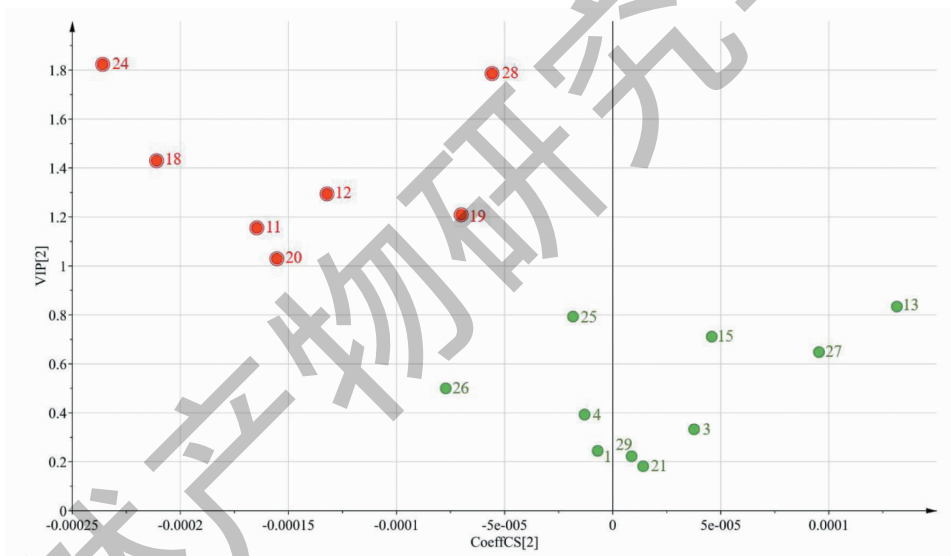


图8 50批菊花样品的 PLS-DA 载荷图

Fig. 8 The PLS-DA diagram of 50 batches of Chrysanthemi Flos

3 讨论与结论

3.1 提取方法的选择

本实验分别考察了不同溶剂(70% 甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇)、提取方式(超声提取和加热回流提取)和提取时间(30、35、40 min)对色谱图的影响,确定采用体积分数为70% 甲醇超声提取40 min 作为提取方法。

3.2 色谱条件的优化

本实验分别考察^[20]了不同的色谱柱(Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱、Phenomenex Luna C₁₈)、检测波长

(220、254、330、348 nm)及流动相体系(乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-0.2% 醋酸水),并以色谱峰峰形、出峰个数及分离度等为评价指标,最终选用 Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长为 348 nm,以乙腈-0.2% 醋酸水溶液作为流动相体系。

3.3 结果分析

实验所建立的5个不同品种菊花对照图谱及菊花对照图谱中标定的共有峰和指认的特征峰有所不同,在建立的亳菊、滁菊、贡菊、杭菊、怀菊对照图谱

中分别标定 21、20、25、22、22 个共有峰,并通过与对照品比对指认出 14、14、12、13、13 个主要特征峰;在 50 批菊花样品共同生成的菊花对照图谱中标定 17 个共有峰,指认出新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 B、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 C、香叶木素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、木犀草素 12 个成分,由于贡菊、杭菊和怀菊中未指认出咖啡酸,贡菊中未指认出金合欢素,因此咖啡酸和金合欢素未作为菊花对照图谱的共有峰。通过对比峰面积,显示木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、芹菜素、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷和异绿原酸 C 所对应的峰面积在 5 个菊花对照图谱之间存在显著性差异:在贡菊和杭菊对照图谱中木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 C 的峰面积较大,而在其他 3 种菊花对照图谱中其峰面积均较小;在亳菊、滁菊与怀菊对照图谱中芹菜素的峰面积较大,而在贡菊和杭菊对照图谱中显示其峰面积很小;在杭菊对照图谱中芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷的峰面积较大,而在其他 4 种菊花对照图谱中其峰面积较小。所以通过对比 5 个品种菊花特征峰之间的差异可以初步地反映出不同品种菊花之间的差异性,表明不同品种菊花中化学成分的种类和含量有一定差异。

相似度评价结果显示种内相似度较高,说明来自不同批次的同一品种菊花之间差异较小;而种间相似度低为 0.391~0.690,表明不同品种菊花所含的化学成分差异较明显。CA、PCA 及 OPLS-DA 均可将 5 个不同品种的菊花较为准确地分成 5 类。5 个品种的菊花虽各不相同但也有相似之处,PCA 及 OPLS-DA 将 5 个特定区域分为左右两大类,其中亳菊、滁菊和怀菊被分为一类(偏药用),贡菊和杭菊被分为一类(偏茶用),化学计量学分析表明木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 C、芹菜素为两大类别的主要差别性成分,这 3 个成分可以作为区分两类菊花特征标志物。OPLS-DA 筛选出 7 个主要标记性成分,通过与混合对照品比对指认出芹菜素、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷和异绿原酸 C 4 个成分,可作为区分不同品种菊花特征标志物,与特征峰峰面积对比结果相互佐证,其中 24、11、20 号色谱峰未指认,这三个色谱峰在菊花质量评价中的作用还有待进一步研究;VIP 值小于 1 的异绿原酸 B、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、香叶木素、隐绿原酸、绿原酸、新绿原

酸、木犀草素、香叶木素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷等 10 个成分可以作为菊花整体的特征标志物。

综上,本实验通过建立并分析 5 种菊花的 HPLC 特征图谱,比较特征峰及其对应峰面积,并进行相似度评价,初步显示出不同品种菊花之间的差异性;通过化学计量学方法分析筛选出不同品种菊花之间相同的物质作为代表菊花功效的特征标志物和体现不同菊花特征的特征标志物,为菊花的品种鉴别及质量评价提供科学依据。

参考文献

- 1 Zhou HP, Ren MX, Guan JQ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Chrysanthemum morifolium* and predictive analysis on quality markers[J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 4785-4795.
- 2 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, 2020:323.
- 3 Yang CF, Dong CM, Xing B, et al. Study on quality of *Chrysanthemum morifolium* from different habitats[J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2018, 20:716-720.
- 4 Sun YM, Xu JZ, Shen XX, et al. Study on quality of different varieties of *Chrysanthemi Flos*[J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2014, 31:224-227.
- 5 Li YF, Yang PY, Luo YH. Chemical compositions of chrysanthemum teas and their anti-inflammatory and antioxidant properties[J]. Food Chem, 2019, 286:8-16.
- 6 Yu J, Yu NJ, Zheng TH, et al. Comparative study on internal qualities of four cultivars of medicinal *Dendranthema morifolium* in Bozhou, China[J]. J Anhui Tradit Chin Med Coll (安徽中医学院学报), 2013, 32(6):86-88.
- 7 Liang SW, Gong JY. Traditional Chinese Medicine Analysis (中药分析)[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2016:82-83.
- 8 Yao LW, Liu Y, Zheng XW, et al. Application of the fingerprint and characteristic fingerprint technology in traditional Chinese medicinal materials and Chinese patent medicine [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2018, 27:934-939.
- 9 Lu SH, Li Q, Fan WY, et al. HPLC fingerprint combined with chemometrics to evaluate the quality of *Pileostegia tomentella* from different areas[J]. Res Pract Chin Med (现代中药研究与实践), 2020, 34(6):52-56.
- 10 Chen Y, Liang S, Lu SH, et al. Evaluation of the quality of

- medicinal materials of Shan Ku Xie from different origins by HPLC fingerprints combined with chemometrics [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43:2477-2481.
- 11 Hu YP, Zhao D, Feng SX, et al. Quality evaluation of Ecliptae Herba based on fingerprint and chemometrics methods [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43:2471-2476.
- 12 Yu NJ, Yu J, Zhang W, et al. HPLC characteristic fingerprint of "Boju" *Chrysanthemum morifolium* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2015, 38:497-500.
- 13 Chen XQ, Liu JS, Zhang DY. Study on the HPLC specific fingerprints of "Chuju" [J]. Guangdong Pharm Univ(广东药科大学学报), 2017, 33:611-616.
- 14 Li TT, Zhang Q, Lai SY, et al. Determination of multi components and pattern recognition of fingerprint of Huai Chrysanthemi Flos [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32:551-556.
- 15 Huang YM, Shi Y, Hu YF, et al. Comparative analysis of the chemical components of chrysanthemum from different regions by HPLC combined with chemometrics methods [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36:1941-1951.
- 16 Liu Y, Gong WL, Bao WZ, et al. Establishment of HPLC fingerprint and comparison of active ingredients between varieties of chrysanthemum in Hubei Province [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44:3711-3717.
- 17 Xu SL, Xing LH, Ren X, et al. Fingerprint identification and evaluation of chrysanthemum in Huizhou Area, Anhui Province, China [J]. J Anhui Univ Chin Med(安徽中医药大学学报), 2019, 38(4):85-89.
- 18 Liu CX, Zhang TJ. Theory and practice of traditional Chinese medicine quality markers(中药质量标志物理论与实践) [M]. Beijing: Science and Technology Press, 2019.
- 19 Zheng RL, Dai J, He YZ, et al. Research progress on prediction and analysis approaches of quality markers (Q-Marker) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52:2566-2574.
- 20 Song L, Zhan CR, Yang SY, et al. Anti-bacterial activity of *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27:455-458.
- (上接第 1288 页)
- 25 Gao K, Tang HF, Lu YY, et al. Chemical constituents in fruits of *Lycium barbarum* L. [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2014, 12:324-327.
- 26 Zhang YJ, Nie H, Zhou DX, et al. Chemical constituents of *Mallotus conspurcatus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48:2172-2176.
- 27 Chen CY, Wu MD, Yeh HC, et al. A novel biphenyl derivative from *Cinnamomum insulari-montanum* [J]. Chem Nat Compd, 2022, 58:18-20.
- 28 Li ZM, Zhang JY, Li F, et al. Research progress on chemical components and pharmacological action of *Hedyotis diffusa* in treating cancer [J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息), 2021, 38(2):74-79.