

福田河白菊与其他菊花栽培品种 HPLC 指纹特征研究

陈科力, 李 鹏, 叶从进, 詹爱萍*

(湖北中医学院, 湖北 武汉 430061)

摘要: 目的 比较不同产地各种菊花栽培品种的 HPLC 指纹特征, 为构建福田河白菊的 HPLC 指纹图谱奠定基础。方法 采用 NERTSL C₁₈ 柱, 乙腈-水(含 2% 四氢呋喃, 0.1% 三氟醋酸)为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃, 对不同菊花栽培品种以及同属其他相关种进行对比色谱分析。结果 构建了菊花的 HPLC 指纹图谱模式, 该模式显示不同产地菊花品种的 HPLC 图谱具有较高的相似性, 有 15 个共有峰, 其中 4 个为 10 强峰, 2 个为 10 强峰或次强峰。指纹数据反映了各品种菊花在地域和亲缘关系上的联系以及各自独特的特征。结论 该色谱系统可以用于构建福田河白菊、湖北金菊等不同菊花品种的指纹图谱。

关键词: 菊花; 野菊花; 神农香菊; 指纹图谱

中图分类号: R 282.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)09-1050-04

HPLC fingerprints of *Flos Chrysanthemi* from Futianhe region and other cultivation breeds

CHEN Ke-li, LI Peng, YE Cong-jin, ZHAN Aiping

(Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Abstract: **Object** To compare the HPLC fingerprints of *Flos Chrysanthemi* from different habitats.

Methods With Inertsil C₁₈ column, gradient elute was performed by mobile phase containing acetonitrile-water (2% tetrahydrofuran, 0.1% trifluoroacetic acid). The flow rate was 1 mL/min and column temperature 30 ℃. Different breeds of *Flos Chrysanthemi* from various producing areas and other species from the same genus were comparatively analyzed. **Results** It is discovered that the HPLC fingerprints from different breeds of *Flos Chrysanthemi* have a strong comparability. They have 16 mutual peaks and among them four are from the ten strongest peaks, two from the ten strongest peaks or stronger peaks. The fingerprint data reflect the affiliation on producing area and genetic relationship of different breeds of *Flos Chrysanthemi*, and also characteristic features of each breed. **Conclusion** This method can be used to establish the HPLC fingerprints of different breeds produced in different areas.

Key words: *Flos Chrysanthemi*; *C. indicum* L.; *C. indicum* var. *aromaticum* Q. H. Liu et S. F. Zhang; fingerprint

菊花是我国的一种常用中药和深受欢迎的保健饮品。福田河白菊是产于湖北麻城福田河地区的白菊花, 其加工方法类似于杭白菊, 长期以来, 以杭白菊之名销往全国各地。近年来, 由于福田河白菊花品质优异, 产量增加, 已成为一种深受欢迎的菊花品牌, 药材市场上已广泛称之为“福田河白菊”。为了便于监控福田河白菊的内在质量, 促进这一品牌商品的发展, 笔者对福田河白菊进行了指纹特征研究, 并与其他产地的菊花栽培品种进行了对比分析, 同时用同属植物野菊花和神农香菊进行对照, 以了解菊花药材的共同指纹特征和福田河白菊的独特特征, 为构建福田河白菊的 HPLC 指纹图谱奠定基础。

1 实验材料

1.1 仪器与试剂: Waters 515 高效液相色谱仪, (Waters 600 E 四元泵, Waters 996 紫外检测器, Waters 脱气机)。水为超纯水, 绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所)。乙腈、三氟醋酸、四氢呋喃为色谱纯, 水为去离子水, 其余试剂均为分析纯。

1.2 药材: 福田河白菊和其他相关菊花品种样品, 经笔者鉴定, 分别为菊科菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 菊科神农香菊 *C. indicum* var. *aromaticum* Q. H. Liu et S. F. Zhang 的干燥头状花序, 菊科野菊花 *C. indicum* L. 的干燥头状花序。来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: InertsilC₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5

* 收稿日期: 2003-12-30

基金项目: 湖北省科技攻关计划重大项目《湖北省地道药材规范化种植及示范基地建设研究》2001AA 304A 菊花子项目

作者简介: 陈科力(1947—), 男, 教授, 从事中药资源和中药质量研究。Tel: (027) 68889106

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

编号	样品	品种	时间	采集或购买地
1	福田河白菊	菊	2001-11	湖北麻城福田河镇(头水花)
2	福田河白菊	菊	2002-03	湖北麻城福田菊花制品厂(盒装一等品)
3	福田河白菊	菊	2002-03	湖北麻城福田菊花制品厂(盒装二等品)
4	桐乡杭菊	菊	2001-11	浙江桐乡(头水花)
5	桐乡杭菊	菊	2002-03	浙江惠盛精致白菊花制品厂(盒装二等品)
6	桐乡杭菊	菊	2002-03	浙江惠盛精致白菊花制品厂(盒装一等品)
7	盐城杭菊	菊	2003-08	武汉市香港路茶叶市场(散货一等品)
8	神农香菊	神农香菊	2001-11	湖北神农架
9	湖北金菊	菊	2001-11	湖北荆州
10	湖北金菊	菊	2003-08	武昌同济堂药店胭脂路分店(盒装一等品)
11	贡菊	菊	2001-11	武昌区药材公司
12	贡菊	菊	2003-08	武昌同济堂药店胭脂路分店
13	野菊花	野菊花	2001-12	武昌蛇山

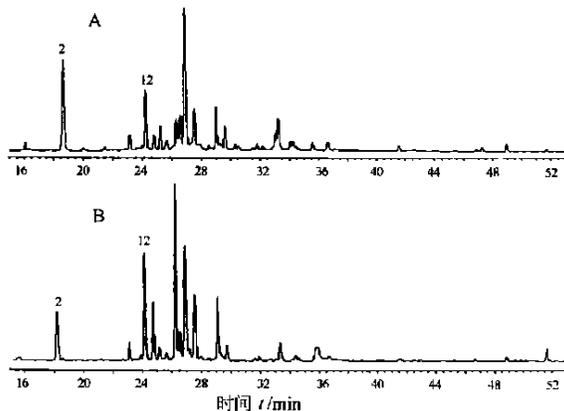


图 1 福田白菊(A)和桐乡杭菊(B)指纹特征峰

Fig. 1 Fingerprint peaks of Flos Chrysanthemi growing in Futianhe (A) and Tongxiang (B)

μm); 乙腈-水(含 2% 四氢呋喃, 0.1% 三氟醋酸)为流动相, 梯度洗脱; 检测波长 328 nm; 进样量 10 μL ; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取绿原酸对照品适量, 用甲醇溶解制成 1.00 mg/mL 溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 取各样品粉末 0.50 g(过一号筛), 加甲醇 10 mL, 超声提取 30 min, 滤过, 滤液过特制 SPE 柱, 将滤液定容至 5 mL 量瓶中, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 HPLC 分析: 取样品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图(图 1)和各色谱峰的保留时间, 以面积归一化法计算各色谱峰的相对峰面积 R_A , 以各谱图中峰面积最大的 10 个峰为 10 强峰(表 2)。

2.5 色谱相对保留指纹谱的构建

2.5.1 相对保留值 α 的计算: 选择一个出峰时间较居中、在各样品中均存在的组份作为参照峰($\alpha=1$)。求出样品所有峰的相对保留值为: $\alpha = t_{Ri}/t_{Ra}$, 式中 t_{Ri} 为各组份的出峰时间, t_{Ra} 为参照峰的出峰时间。

2.5.2 参照峰的选择: 通过与对照品的色谱图比较, 可知各样品色谱图中 2 号峰为绿原酸峰, 选取 2 号峰后, 保留时间在 (24.23 ± 0.08) min, 色谱图中的第 2 个强峰(12 号峰)为参照峰, 计算各峰的相对保留值 α 。

2.5.3 α 值窗口的设定: 计算各样品色谱图中同一峰位 α 值的平均值, 作为每个色谱峰的标准 α 值。计算每个峰位 α 值的 RSD 值, 除 1 号峰的 RSD =

1.3% 外, 其余 α 值 RSD 均小于 1%。所以设定窗口 1%, 同一窗口内的色谱峰认定为同一 α 值的色谱峰, 予以归并, 可信限范围在 $\pm 1\%$ 。

2.5.4 指纹谱的建立: 按标准 α 值的大小排序, 在每个色谱峰的 α 值下标出该组份用归一化法计算的相对峰面积值(R_A)。每个样品色谱峰的相对保留值和相对峰面积 R_A 构成了其 HPLC 指纹特征(表 2)。

2.6 重叠率: 以某样品的指纹谱为基准, 以其峰数与被比较样品的峰数之和为分母, 两者共有峰的两倍为分子, 求得其百分率即为峰的重叠率。

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验: 取样品(1)供试品溶液连续进样 5 次, 测得共有峰 27 个, 各共有峰的相对保留值的 RSD < 1%, 10 个主要共有峰峰面积的 RSD 为 0.7% ~ 2.7%。

2.7.2 稳定性试验: 取样品(1)供试品溶液在 0、2、4、12、24 h 分别进样, 测得各共有峰的相对保留值的 RSD < 1%, 10 个主要共有峰峰面积的 RSD 为 0.5% ~ 3.6%。

2.7.3 重现性试验: 取样品(1)5 份, 按供试品溶液制备方法制备, 分别进样, 测得各共有峰的相对保留值的 RSD < 1%, 10 个主要共有峰峰面积的 RSD 为 1.1% ~ 4.8%。

3 讨论

3.1 由表 2 可见, 菊花(福田河白菊、桐乡菊花、盐城菊花、贡菊、湖北金菊等)有 16 个共有峰, 其中 α 值为 0.756、1.000、1.114、1.141 峰为 10 强峰, α 值为 1.061、1.373 峰为 10 强峰或次强峰(相对峰面积 R_A 大于 1), 可以作为不同菊花栽培品种的共同指纹特征。

表 2 样品中的 α -RA 指纹特征
Table 2 α -RA Fingerprint characteristics of samples

色谱峰	α 值	RA												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1#	0.651	1.12	1.08	0.91	0.66	0.75	1.20	1.26	0.75	0.65	0.50	1.04	0.68	
2#	0.756	<u>12.66²</u>	<u>12.59²</u>	<u>8.39</u>	<u>10.70</u>	<u>6.97</u>	<u>11.07³</u>	<u>9.12³</u>	<u>5.23</u>	<u>9.68³</u>	<u>6.80</u>	<u>10.32</u>	<u>10.39³</u>	<u>0.97</u>
9	0.956	<u>1.91</u>	<u>2.33^o</u>	2.13	1.59	1.74	<u>2.63^o</u>							
11#	0.990	0.65	1.59	1.46	0.60	*	1.25	*	*	*	*		0.53	
12#	1.000	6.83 ³	10.68 ³	11.62 ³	10.08 ³	10.82 ³	11.42 ²	3.74	7.73 ³	5.96	4.35	13.28 ³	<u>7.75</u>	
13#	1.024	2.14	1.95	1.98	7.24	6.22	1.76	2.09	4.26	4.27 ^o	3.73	1.88	1.21	
14	1.042	3.04	2.12	1.87	2.05	1.57	1.93	1.11						
15#	1.061	1.82	1.61	1.08	1.26	1.08	1.14	1.64	3.94	5.06	4.23	1.52	1.32	
17#	1.089	4.38	8.57	13.58 ²	13.84 ²	20.87 ¹	8.62	1.31	2.01	1.64	1.15	5.63	<u>2.65^o</u>	
18#	1.101	5.10	3.44	1.59	1.53	3.41	3.81	2.85	0.66	1.51	2.25	4.54	<u>4.92</u>	
19#	1.114	21.61 ¹	24.36 ¹	16.82 ¹	19.68 ¹	16.48 ²	21.87 ¹	29.14 ¹	11.01 ²	19.86 ¹	13.68 ²	29.40 ¹	<u>32.80¹</u>	
20	1.127	0.89			3.20	1.54	0.83	1.81			0.97	1.54		
21#	1.141	7.65	9.68	6.88	7.29	8.84	7.87	10.41 ²	5.55	7.32	5.47	13.33 ²	<u>15.19²</u>	
22#	1.154	1.39	1.36	1.38	1.95	0.76	1.35	1.53	*	1.08	0.74	1.13	0.51	
24#	1.207	5.87	4.08	2.53	3.14	7.75	3.47	1.78	1.05	1.03	1.04	1.95	<u>2.04</u>	
26#	1.219	0.62	0.60	0.49	0.63	*	0.66	2.92	0.65	0.74	0.84	1.32	0.95	
27	1.231	3.30	3.26	3.37	1.85	1.75	3.08	3.23		0.71				
29	1.254	0.66	0.99	1.66			1.08							
31	1.302		0.55	1.19			*		1.17	1.21				
32	1.314	0.94	1.47	<u>2.76</u>			1.45		1.40	0.94	1.18	1.47	<u>4.50</u>	
33	1.330	0.59	0.45		0.44		0.30	2.41	0.70	1.05	0.68	<u>2.22</u>	<u>3.53</u>	
34	1.346							1.00	0.57	0.58	1.04			
35	1.363	2.43	0.83	0.70	0.37		0.95				0.47			
36#	1.373	<u>4.53</u>	1.91	<u>3.11</u>	<u>4.59</u>	<u>2.41^o</u>	2.38	<u>3.94</u>	<u>6.00</u>	<u>4.93</u>	<u>5.50</u>	1.77	1.00	<u>9.29²</u>
37	1.406	1.10	0.65											
38	1.412	1.13			0.48		0.61	<u>3.13</u>	<u>2.70^o</u>	<u>2.71</u>	2.79	0.74	0.72	
39	1.436							<u>4.05</u>	0.62	0.79	0.80			
41	1.471	0.98		<u>8.60</u>	0.89	<u>4.69</u>	<u>5.71</u>	<u>7.54</u>	2.68	2.25	<u>8.00³</u>		<u>6.38</u>	<u>8.82</u>
42#	1.512	1.44	1.09	1.91	0.62	0.92	1.17	*	1.14	0.58	0.64	0.67	*	<u>4.78</u>
43	1.526								1.63	0.75	1.30			<u>1.39</u>
46	1.592								0.85	0.80	0.72			
48#	1.715	0.94	0.33	0.81	0.38	*	0.58	*	1.88	1.64	1.97	1.02	0.68	<u>2.56</u>
51	1.891								<u>5.83</u>	<u>4.40</u>	<u>5.41</u>	0.95		
53	1.990								<u>26.58¹</u>	<u>13.78²</u>	<u>17.93¹</u>	<u>1.83</u>	0.44	
54	2.018	1.00	0.27	0.44	0.93	*	*	1.40						<u>23.90²</u>
55	2.135				0.95	1.44		2.59		1.65	1.00	1.27		<u>45.31¹</u>

下划线(例8.60)表示 10 强峰,角标(例10.41²)表示第 1~3 强峰,* 表示相对峰面积 0.30%。# (例 48#) 表示菊花共有峰

Underline indicates peaks in ten strongest peaks in area such as 8.60; superscript indicates first to third peak such as 10.41²;

* indicates the relative peak area 0.30%; # indicates mutual peaks of *Flos Chrysanthemi* such as 48#

3.2 福田河菊据称引种于浙江桐乡,由表 3 可见,福田白菊除有菊花的 16 个共有峰外,还有 7 个共有峰, α 值分别为 0.956、1.042、1.231、1.254、1.314、1.363、2.018,其中 α 值为 1.231 的峰为 10 强峰, α 值为 0.956、1.042 和 1.314 的峰为 10 强峰或次强峰(相对峰面积大于 0.9%)。这些峰中 5 个峰与杭菊中桐乡菊花和(或)盐城菊花共享,说明福田河白菊接近杭菊,但每种菊花都有不同的指纹特征,可以区别开。

3.3 根据武昌区药材公司的调查,湖北金菊据称为神农香菊和黄山贡菊的杂交品。从表 3 分析,湖北金菊与神农香菊有较大相似性,他们有 27 个共有峰,

其中 α 值为 0.756、1.000、1.024、1.061、1.114、1.141、1.373、1.412、1.891、1.990 等 10 组峰均为 10 强峰或较强峰(相对峰面积大于 2.5%),另有 5 组峰均为次强峰(相对峰面积大于 1.0%),其色谱峰相对保留值的重叠率接近 100%,但神农香菊峰 1.990 为最强峰,相对峰面积为 26%,高于湖北金菊约 1 倍,图形有较大差异。湖北金菊与贡菊也有一定相似性,它们有 20 个共有峰,其色谱峰相对保留值的重叠率为 85%。

3.4 野菊花和神农香菊仅作为同属不同种植物的参照标准,只采了一个样品。由图谱分析,野菊花

表 3 菊花不同栽培品种的指纹特征

Table 3 Fingerprint characteristics of different cultivars of *Flos Chrysanthemi*

样 品	α							
福田白菊	<u>0.956</u>	<u>1.042</u>	(1.127)	<u>1.231</u> *	1.254	<u>1.314</u>	(1.330)	(1.412)
桐乡杭菊	<u>0.956</u>	<u>1.042</u>	1.127	<u>1.231</u>	(1.254)	1.314	(1.330)	(1.412)
盐城杭菊		<u>1.042</u>	1.127	<u>1.231</u> *			1.330	<u>1.412</u> *
贡 菊						<u>1.314</u>	<u>1.330</u> *	1.412 (1.891) <u>1.990</u>
湖北金菊			(1.231)			1.314	1.330	1.412 1.891* <u>1.990</u> *
神农香菊						1.314	1.330	1.412* 1.891* <u>1.990</u> *

下列线加 * 表示 10 强峰, 下划线表示 10 强峰或次强峰(相对峰面积大于 0.90%), 括号表示部分样品有这一特征峰

Underline and * indicate peaks are among ten largest peaks in area; Underline indicates ten largest peaks or near to ten largest peaks (their relative peak area > 0.90%); brackets indicate that only a part of this cultivar have specific peak

与菊花有明显的区别, 也有共同点。神农香菊作为野菊花的变种, 与野菊花的指纹数据差异较大, 其保留时间重叠率为 40%, 而与菊花类指纹数据较为接近, 与贡菊、杭菊(桐乡)、福田河白菊的重叠率分别为 85%、69% 和 71%, 但其尾部峰形又呈现野菊花的趋势。

3.5 由表 2, 3 可见, 图谱数据呈现明显的分类学特征: 其中杭菊系列的 3 种菊花(福田河白菊、桐乡杭菊、盐城杭菊)有较大的相似性, 他们的共有峰和强度较高的峰集中在谱图较前面的高极性部分(0.956~1.314); 而贡菊和湖北金菊的共有峰集中在谱图靠后面的低极性部分(1.314~1.900), 其中湖北金菊继承了神农香菊的品质, 其 α 值为 1.990 的峰为第一或第二强峰, 说明它们含有较大比例的芳香成分。虽然由于各品种菊花的样本太少, 难以非常准确地总

结各自的独特指纹特征, 但各样品图谱准确反映了各品种在地域和亲缘关系上的联系和区别。

综上所述, 菊花不同栽培品种同一指纹峰的相对保留值(α 值)的 RSD 小于 1% (仅 1# 共有峰的 RSD = 1.3%), 图谱具有较高的稳定性和可比性; 每一品种又有较多的 10 强峰和次强峰, 峰形也有较大的相似性; 同时图谱数据也反映了菊花各品种在地域和亲缘关系上的区别和联系, 并能与其他同属近缘植物区别开。因此, 该方法可以用于构建福田河白菊、湖北金菊、杭菊、贡菊等不同产地菊花的指纹图谱。由于菊花含有大量黄酮和色素, 易氧化, 同时各样品又采集于不同时间段, 商品等级也不同, 所以不同品种、不同样品共有峰的峰面积比有较大差异, 所以制定各栽培品种菊花的指纹图谱需要根据采收时间、储存条件、商品等级等进一步进行研究。

新疆药用桑树 9 个栽培群体的 RAPD 分析

傅大煦¹, 张 辉², 陈 纹², 苏 雪², 孙 坤^{2*}, 陈家宽^{1*}

(1. 复旦大学生物多样性科学研究所, 上海 200433; 2. 西北师范大学植物研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 目的 从 DNA 分子水平上分析新疆药用桑树资源 9 个栽培群体的遗传关系。方法 从 100 个随机引物中筛选出 10 个引物, 用这 10 个引物做 RAPD 扩增, 应用 NTSYS 软件对扩增结果进行聚类分析。结果 共扩增出 108 个位点, 其中多态性位点 91 个, 多态比例为 84.26%, 各群体间存在较明显的遗传分化。另外, 获得药桑的 8 个特异位点。结论 RAPD 分析结果与新疆药用桑树资源植物的遗传关系的传统划分是基本一致的。

关键词: 桑树; 栽培群体; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: R282.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)09-1053-04

RAPD analysis of nine populations of medicinal mulberry cultivated in Xinjiang

FU Da-xu¹, ZHANG Hui², CHEN Wen², SU Xue², SUN Kun^{2*}, CHEN Jia-kuan¹

(1. Institute of Biodiversity Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Institute of Botany, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

* 收稿日期: 2004-02-12

作者简介: 傅大煦(1963—), 男, 江苏人, 研究员, 博士, 主要从事天然药物的研究与开发和管理工作。

* 通讯作者