

基于指纹图谱和多成分含量测定的艾纳香药材质量评价

胡璇¹, 王鸿发³, 于福来^{1*}, 元超¹, 黄梅¹, 张影波¹, 陈振夏¹, 王丹¹, 庞玉新²

1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 海南省艾纳香工程技术研究中心, 海南 海口 571101

2. 广东药科大学中药资源学院, 广东 云浮 527300

3. 宁夏泰益欣生物科技有限公司, 宁夏 银川 750001

摘要: 目的 基于 HPLC 指纹图谱、化学模式识别以及多成分含量测定相结合的方法, 评价不同产区艾纳香药材的质量。方法 建立 4 个不同产区 34 批艾纳香 HPLC 指纹图谱, 确定共有峰, 根据前期提取分离出的艾纳香单体成分指认了其中 5 个色谱峰并测定样品中含量, 结合相似度分析、聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 等化学模式识别方法以及药材综合质量评分寻找不同产区艾纳香药材中的差异。结果 化学指纹图谱共标定 15 个共有峰, 各批艾纳香样品相似度在 0.433~0.977, 4 个产区艾纳香样品在化学组分和含量上存在差异。4 个产区的艾纳香药材基本上可以分为 4 类, 每个产区大部分样品各自分布于不同的象限, 不同产区之间有交叉样品, 样品之间的离散程度较大, 每个产区的样品本身质量就存在较大差异, 尤其是海南和广西样品。通过变量权重重要性排序 (variable importance in projection, VIP) 值图确定了 5 个产区差异性指标成分, 综合质量评分中 3 份海南琼中产样品评分排在前三位。测定 5 个黄酮类成分含量中 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮和 sakuranrin 均以贵州产整体含量较高, 艾纳香素以海南产整体含量较高。结论 结合 HPLC 指纹图谱、HCA、PCA 及多指标定性定量等分析方法可以更全面地评价艾纳香药材质量, 为艾纳香药材质量控制和优良种质资源选育提供参考依据。

关键词: 艾纳香; HPLC 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 多成分含量测定; 质量评价; 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮; 圣草酚; 3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮; 艾纳香素; sakuranrin

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3679-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.026

Quality evaluation of *Blumea balsamifera* based on fingerprint analysis and quantitative analysis of multi-components

HU Xuan¹, WANG Hong-fa³, YU Fu-lai¹, YUAN Chao¹, HUANG Mei¹, ZHANG Ying-bo¹, CHEN Zhen-xia¹, WANG Dan¹, PANG Yu-xin²

1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Hainan Provincial Engineering Research Center for *Blumea balsamifera*, Haikou 571101, China

2. School of Chinese Materia Medica Resources, Guangdong Pharmaceutical University, Yunfu 527300, China

3. Ningxia Taiyixin Biotech Co., Ltd., Yinchuan 750001, China

Abstract: **Objective** The quality of *Blumea balsamifera* from different regions was evaluated based on the method of HPLC fingerprint, multi-component quantification and chemical pattern recognition. **Methods** The HPLC fingerprints of 34 batches of *B. balsamifera* from different regions in four provinces were established to determine the common peaks. Five chemical components were identified and determined according to the monomer composition extracted from *B. balsamifera* at early stage. The differences in the herbs from different regions were searched by integrating cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and comprehensive quality score. **Results** Fifteen common peaks were selected in the chemical fingerprint. Similarity of all the *B. balsamifera* samples were ranged from 0.433 to 0.977, suggesting

收稿日期: 2020-10-03

基金项目: 海南省自然科学基金资助项目(2019CXTD414); 海南省自然科学基金资助项目(319QN312); 农业农村部部门预算项目子任务(RZJP202006); 国家热带植物种质资源库项目

作者简介: 胡璇 (1986—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事南药资源研究与开发工作。E-mail: mchuxuan@163.com

*通信作者: 于福来, 博士, 副研究员, 主要从事中药(南药)资源定向培育及综合开发利用研究。Tel: (0898) 66961352 E-mail: fulai.yu@163.com

that there are differences in chemical composition and content of *B. balsamifera* samples from four different regions. The samples from four regions were divided into four groups basically and most samples of each region were distributed in different quadrants. There were overlapping samples in different regions and the degree of dispersion among samples was large, which showed that the quality of the samples from each origin varies greatly, especially for Hainan and Guangxi. Five components were confirmed as the main compositions which caused the differences of chemical constituents in the samples from different regions through the VIP value map. Three samples from Qiongzong county of Hainan ranked the top three in the comprehensive quality scores. In the determined five chemical components, the overall contents of 3,3',5,7-tetrahydro-4'-methoxy dihydroflavones, eriodictyol, 3,3',5-trihydroxy-4',7-dimethoxy dihydroflavones and sakuranrtin were higher in Guizhou than other origins, while the overall content of blumeatin is higher in Hainan than other origins. **Conclusion** The quality of *B. balsamifera* can be evaluated more comprehensively combined with fingerprint, cluster analysis and principal component analysis, which can provide reference for the quality control and breeding of elite germplasm resources.

Key words: *Blumea balsamifera* (L.) DC.; HPLC fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; quantitative analysis of multi-components; quality evaluation; 3,3',5,7-tetrahydro-4'-methoxy dihydroflavones; eriodictyol; 3,3',5-trihydroxy-4',7-dimethoxy dihydroflavones; blumeatin; sakuranrtin

艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 是菊科艾纳香属多年生草本植物, 在黎族、苗族等少数民族药用历史悠久, 具有祛风除湿、清热解毒、调经、镇痛等功效^[1]。艾纳香含有丰富的挥发油成分, 包括 *L*-龙脑、 β -石竹烯、樟脑、 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬醇等^[2], 这些化学成分是艾纳香发挥修复皮肤黏膜损伤^[3]、抗炎^[4]、抑菌^[5]等作用的主要物质基础; 艾纳香中还含有大量黄酮类成分, 包括黄酮醇类、二氢黄酮类、查耳酮类等化合物^[6], 是艾纳香抗氧化^[7]、保肝^[8]、止血凝血^[8]、抗肿瘤^[9]等作用的主要有效成分。

随着艾纳香在医药、日化用品等领域应用日益广泛, 其需求量不断攀升, 其药材从野生到栽培分布区域也日趋扩大分散, 从主产区贵州辐射周边热带地区, 包括海南、广东、广西、云南等地区均有艾纳香资源的分布^[10], 而因为土壤、光照、水分、CO₂ 浓度等因素的不同造成的地域差异性也成为艾纳香整体质量评价需要考虑的因素。目前大部分的文献资料显示艾纳香多以挥发油类成分或黄酮类成分艾纳香素^[11-12], 或者以单一粗提物总黄酮或总挥发油进行药材的整体质量控制^[13-14], 缺乏多手段多指标成分的系统性研究。本研究采用高效液相色谱法, 建立艾纳香的 HPLC 指纹图谱获得化学数据, 从艾纳香指纹图谱特征成分的角度, 结合聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 等化学模式识别方法分析比较不同产区艾纳香质量差异。在课题组前期提取分离得到的艾纳香单体成分基础上^[15], 指认并测定了 5 个黄酮类成分的含量, 通过多成分含量测定进一

步寻找产区差异性成分, 为全面、系统地评价艾纳香药材质量提供科学的理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

34 批不同产区的艾纳香药材收集于广东、广西、贵州和海南 4 个省份, 经中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所于福来副研究员鉴定为艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC., 药材来源信息见表 1。本研究所需 5 个二氢黄酮对照品均来自作者所在课题组前期通过制备色谱从艾纳香中系统分离纯化获得的单体化合物^[15], 分别为 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin。乙腈、甲醇为色谱纯 (赛默飞世尔科技有限公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪 (G1311C 四元泵, G1316A 柱温箱, G1329B 全自动进样器, G1315D 二极管阵列检测器), Agilent ChemStation 工作站; SKQ-600DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 德国 Merck Millipore/Direct-Q5 UVR 超纯水系统 (广州市东方科苑进出口有限公司); ME54E 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱及含量测定色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) -0.5%磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 15%~22% A; 15~21 min, 22%~24% A; 21~30 min, 24%~30% A; 30~45

表1 艾纳香样品信息

Table 1 Sources of 34 batches of *B. balsamifera* samples

编号	样品编号	产区	编号	样品编号	产区
1	GD-1	广东广州	18	GZ-2	贵州罗甸县沟亭乡
2	GD-2	广东广州	19	GZ-3	贵州罗甸县沟亭乡
3	GD-3	广东广州	20	GZ-4	贵州罗甸县沟亭乡
4	GD-4	广东广州	21	GZ-5	贵州罗甸县罗苏乡
5	GX-1	广西隆林县新州镇	22	GZ-6	贵州罗甸县罗苏乡
6	GX-2	广西南宁	23	GZ-7	贵州罗甸县罗苏乡
7	GX-3	广西田林县八渡瑶族乡	24	GZ-8	贵州望谟县
8	GX-4	广西田林县八渡瑶族乡	25	GZ-9	贵州贞丰县珉谷镇
9	GX-5	广西田林县乐里镇	26	HN-1	海南琼中县长征镇
10	GX-6	广西田林县潞城瑶族乡	27	HN-2	海南琼中县长征镇
11	GX-7	广西田林县潞城瑶族乡	28	HN-3	海南琼中县中平镇
12	GX-8	广西田林县潞城瑶族乡	29	HN-4	海南琼中县中平镇
13	GX-9	广西田林县潞城瑶族乡	30	HN-5	海南省琼中县营根镇
14	GX-10	广西西林县八达镇	31	HN-6	海南省琼中县营根镇
15	GX-11	广西西林县那劳镇	32	HN-7	海南省屯昌县南吕镇
16	GX-12	广西西林县普合乡	33	HN-8	海南省万宁市市长丰镇
17	GZ-1	贵州罗甸县沟亭乡	34	HN-9	海南省五指山市

min, 30%~33% A; 45~55 min, 33%~38% A; 55~70 min, 38%~55% A); 检测波长 285 nm; 柱温 35 °C; 体积流量 0.9 mL/min; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin 适量配制成质量浓度分别为 1.02、0.241、0.203、0.205、0.016 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 34 份不同产区艾纳香叶样品粉碎后过 30 目筛, 精密称取样品 0.5 g 于具塞锥形瓶中, 精密加入 90%甲醇 10 mL, 称定质量, 超声处理 45 min, 放至室温, 再称定质量, 用 90%

甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系及定量限、检测限 精密量取 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素混合对照品储备液和 sakuranrtin 对照品储备液用倍比稀释的方法以 90%甲醇制成系列对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下, 所得溶液 10 μL 进样测定其峰面积。以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 计算回归方程。按“2.2.1”项下方法配制混合对照品溶液用 90%甲醇逐级稀释, 按照信噪比 (S/N) 为 3:1 的对照品溶液质量浓度为检出限 (LOD), 以 S/N 为 10:1 的对照品溶液质量浓度确定为定量限 (LOQ), 结果见表 2。

表2 5种成分的回归方程、相关系数及线性范围、定量限和检测限

Table 2 Calibration curves, correlation coefficients, linear ranges, limit of quantitation and detection of five constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	LOD/(μg·mL ⁻¹)	LOQ/(μg·mL ⁻¹)
3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮	$Y=25\ 275 X+86.72$	0.999 9	0.05~1.02	0.04	0.77
圣草酚	$Y=37\ 687 X+8.96$	0.999 9	0.003~0.24	0.13	0.31
3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮	$Y=32\ 410 X+6.49$	0.999 9	0.01~0.22	0.35	0.52
艾纳香素	$Y=36\ 976 X+6.56$	0.999 9	0.01~0.24	0.16	0.65
sakuranrtin	$Y=46\ 779 X-2.34$	0.999 8	0.0004~0.016	0.11	0.29

2.3.2 精密度试验 精密称取艾纳香样品 (GD-1) 粉末 0.5 g, 依照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 记录其指纹图谱, 以 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢

黄酮为参比峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 相对保留时间的 RSD 在 0.06%~0.29%, 各共有峰的相对峰面积的 RSD 在 0.04%~1.50%。精密吸取混合对照品溶液, 计算 3,3',5,7-四羟基-4'-

甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin 峰面积的 RSD 分别为 0.11%、0.09%、0.11%、0.10%、0.20%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取艾纳香样品 (GD-1) 粉末，依照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下的色谱条件进行分析，记录其指纹图谱，以 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮为参比峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，相对保留时间的 RSD 在 0.03%~0.18%，各共有峰的相对峰面积的 RSD 在 0.27%~3.12%。计算 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin 峰面积的 RSD 分别为 2.98%、2.64%、2.52%、2.46%、2.59%，表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取艾纳香样品 (GD-1) 供试品溶液，分别于供试品溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项下的色谱条件进样，记录其指纹图谱，以 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮为参比峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，相对保留时间的 RSD 在 0.03%~0.18%，各共有峰的相对峰面积的 RSD 在 0.08%~2.75%。计算 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin 峰面积的 RSD 分别为 0.28%、0.33%、0.19%、0.21%、2.32%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称定已测定的艾纳香样品粉末约 0.5 g，置 10 mL 量瓶中，分别精密加入配制好适量质量浓度的 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin 各自 0.5、1.0、1.5 mL，每个体积重复 3 次，加入一定量 90% 甲醇定容至 10 mL，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项色谱条件进行含量测定，计算平均加样回收率和 RSD 值。结果显示 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin 平均加样回收率分别为 101.1%、100.7%、100.4%、100.9%、99.6%，RSD 分别为 1.21%、2.15%、2.44%、1.47%、2.21%。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 指纹图谱共有模式的建立及相似度评价 将 4 个产区 34 批艾纳香样品在检测波长为 285 nm 处

的色谱图以 AIA 格式导出并导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2004 版) 软件，以 GD-1 编号样品的指纹图谱作为参照图谱，采用中位数法，时间宽度为 0.5 进行多点校正和色谱峰匹配，得到艾纳香叠加指纹图谱 (图 1)。保留时间为 20.78 min 的 7 号色谱峰分离良好且为所有样品共有，故确定选取作为参照峰，其余特征峰以 1、2、3……N 进行标定，共标定 15 个共有特征峰，见图 2-A。经与对照品对比，

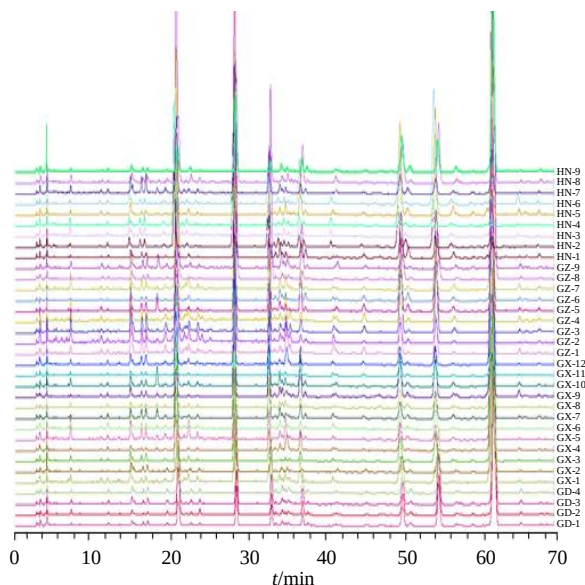
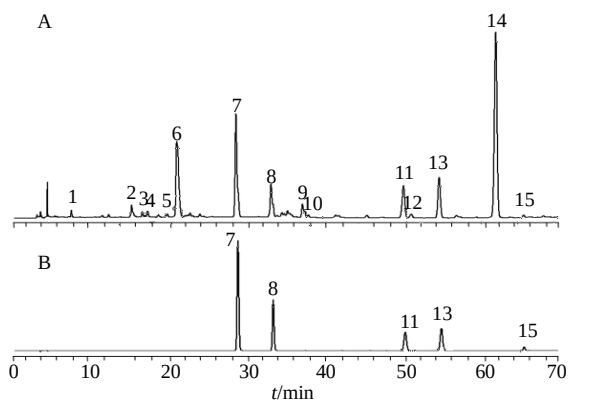


图 1 34 批不同产区艾纳香样品的 HPLC 叠加指纹图谱
Fig.1 Superposition HPLC fingerprints of 34 batches of *B. balsamifera* samples from different regions



7-3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮 8-圣草酚 11-3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮 13-艾纳香素 15-sakuranrtin
7-3,3',5,7-tetrahydro-4'-methoxy dihydroflavones 8-eriodictyol
11-3,3',5-trihydroxy-4',7-dimethoxy dihydroflavones 13-blumeatin
15-sakuranrtin

图 2 艾纳香对照指纹图谱 (A) 和混合对照品溶液的 HPLC 图 (B)

Fig.2 HPLC comparison fingerprint (A) and mixed reference substances (B) of *B. balsamifera*

表 3 34 批艾纳香样品指纹图谱相似度评价

Table 3 Similarity evaluation of 34 batches of *B. balsamifera* samples

样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度
GD-1	0.903	GX-9	0.946	GZ-9	0.839
GD-2	0.895	GX-10	0.643	HN-1	0.569
GD-3	0.900	GX-11	0.977	HN-2	0.534
GD-4	0.900	GX-12	0.955	HN-3	0.467
GX-1	0.962	GZ-1	0.960	HN-4	0.433
GX-2	0.877	GZ-2	0.671	HN-5	0.709
GX-3	0.988	GZ-3	0.466	HN-6	0.435
GX-4	0.920	GZ-4	0.663	HN-7	0.644
GX-5	0.963	GZ-5	0.682	HN-8	0.567
GX-6	0.965	GZ-6	0.883	HN-9	0.894
GX-7	0.940	GZ-7	0.977		
GX-8	0.966	GZ-8	0.880		

其中 7、8、11、13、15 号共有峰分别对应 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin，艾纳香对照指纹图谱和混合对照液的对照色谱图分别见图 2-A 和图 2-B。

将 4 个产区 34 批不同产区艾纳香药材图谱与对照指纹图谱进行相似度评价，相似度结果见表 3。与对照指纹图谱相比，广东和广西相似度比较高，除了样品 GD-2、GX-2、GX-10 相似度低于 0.90，其他样品相似度结果均大于 0.90，而贵州和海南具有较低的相似度，除了样品 GZ-1 和 GZ-7 其他贵州产样品相似度结果均低于 0.90，海南相似度在 0.433~0.894。结果表明不同产区的艾纳香样品药材质量是存在一定地域差异性。广东和广西化学组分特征更为相似，贵州和海南的化学组分特征较为相似，这几个产区表现出的组分差异集中在 21~29 min 和 34~38 min，每个样品的图谱中贵州和海南 0~40 min 段化学组分色谱峰信息量显著多于广东和广西，且不同产区色谱峰面积大小上也是存在差异，广东和广西在 50~70 min 段化学组分 14 号峰峰面积显著高于贵州和海南，而贵州和海南部分样品在 20~30 min 段化学组分 7 号(3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮)和 8 号峰(圣草酚)峰面积显著高于广东和广西。

2.4.2 聚类分析 (HCA) 将艾纳香各个共有峰的峰面积相对于参照峰 7 号(3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮)峰面积进行量化，得到 15×34 阶数据矩阵，导入 IBM SPSS 19.0 软件中，数据标准化后进行聚类分析，采用 Ward 联结法，欧式距离平

方和作为样本测度，聚类树状图见图 3。根据聚类结果可以看出，当判别距离为 10 时，34 批艾纳香样品大致样品可以分成 3 类，I 类(9 份广西、8 份贵州和 6 份海南)，II 类(4 份广东、3 份广西和 1 份贵州)，III 类(3 份海南)，这些产区依旧存在个体差异较大的样品。当聚类距离为 5 时，34 批样品可以划分为 5 大类，I 类(8 份贵州，7 份广西和 1 份海南样品)，II 类(5 份海南和 2 份广西)，III 类(4 份广东，3 份广西和 1 份贵州)，IV 类(2 份海南)，V (1 份海南)，4 个产区的艾纳香样品依旧比较分

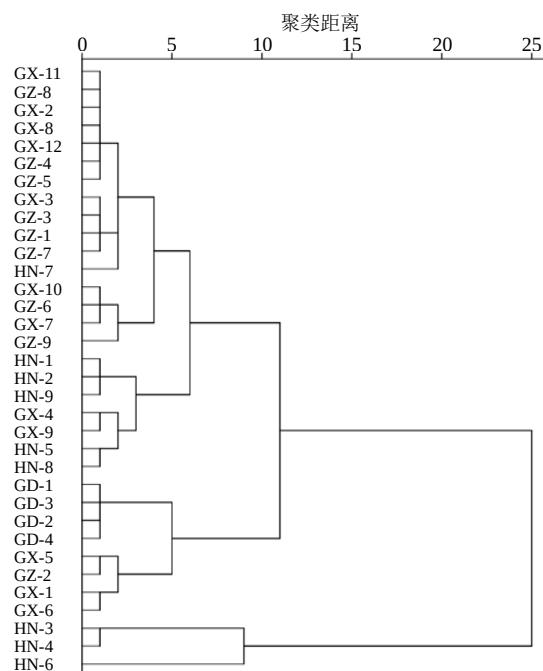


图 3 艾纳香样品聚类分析树状图

Fig.3 Cluster analysis of *B. balsamifera* samples

散,但是 2 次结果的第 I 类仍能大部分的贵州和广西样品聚为一类,说明贵州和广西的大部分样品具有一定的相似性,相对于其他产区样品海南产样品自身存在较大差异。

2.4.3 主成分分析 (PCA) [16] 进一步探讨 4 个产区艾纳香化学成分之间的差异,将上述 15×34 阶矩阵导入 SIMCA-P+14.1 软件中,以 15 个共有色谱峰的相对峰面积值作为变量,采用非监督模式识别方法 PCA 来观察不同产区 34 份艾纳香样品的自然聚集。模型拟合选择 4 个主成分,累计贡献率为 82.90%,模型拟合能力良好,34 批艾纳香样品的三维 PCA 矩阵图见图 4。可以看出海南产区艾纳香样品化学成分的量上与其他产区样品具有明显差异,基本能与其他产区区分,海南样品的分散性与聚类结果基本一致,其中 HN-6 单独一类,HN-4 和 HN-3 一类,HN-5、HN-1、HN-9、HN-2 一类,但是其他产区样品并不能很好的区分开来。除了 GZ-9、GZ-2、GX-6、GX-1、GX-5,大部分贵州、广西以及广东样品具有交叉,化学成分含量上具有一定的相似性。

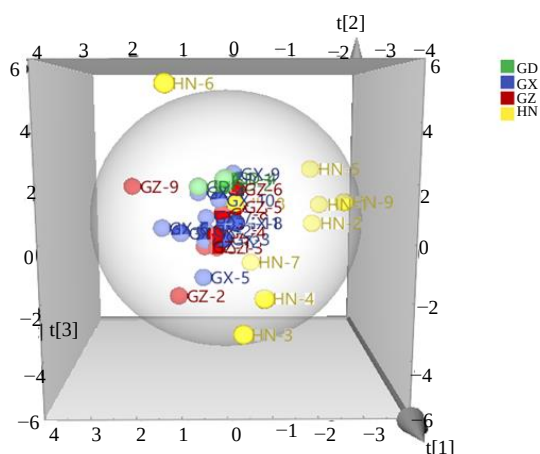


图 4 34 批艾纳香样品的 PCA 得分图

Fig.4 PCA scores plots of *B. balsamifera* samples

2.4.4 偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) [17] 在 PCA 的基础上进一步选择有监督模式的 OPLS-DA 对不同产区 34 份艾纳香样品进行分析,筛选出对引起组间差异贡献率较大的成分。在建立的 OPLS-DA 模型中,累计解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.893 和 0.665,预测能力参数 (Q^2) 为 0.446,提示本实验所建立 OPLS-DA 模型的稳定性及预测能力较好[18]。由 OPLS-DA 得分图可知(图 5),4 个产区的艾纳香药材基本上可以分为 4 类,8 份海

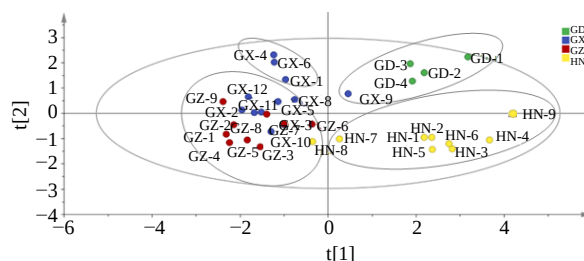


图 5 34 批艾纳香样品的 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA scores plots of *B. balsamifera* samples

南样品单独可以分为一类,4 份广东样品和 1 份广西样品可聚为一类,9 份贵州样品、7 份广西样品和 1 份海南样品聚为一类,3 份广西样品单独聚为一类。每个产区大部分样品各自分布于不同的象限,不同产区之间有交叉样品,主要表现在大部分的贵州和广西的样品可聚为一类,这与聚类分析的结果基本一致。每个产区样品之间的离散程度较大,结果提示每个产区的样品本身质量就存在较大差异,尤其是海南和广西样品。

对 4 组数据的差异性进行整体分析,得到变量权重重要性排序(variable importance in projection, VIP)预测值,在 0.95 的置信区间内。OPLS-DA 模型中 14 个色谱峰的 VIP 见图 6, VIP 越大,表明该色谱峰对于不同产区艾纳香的分类贡献越大,也即为最能导 4 个产区艾纳香样品相区分的差异成分,选取 VIP>1 的 5 个化合物作为差异性标志物,按 VIP 大小排序依次为 14 号峰>8 号峰(圣草酚)>12 号峰>2 号峰>10 号峰,这些成分在区分不同产区间艾纳香起到重要作用,是其差异的主要标志。

2.4.5 综合质量评分[19] 以上述 4 个主成分对不同产区 34 批艾纳香样品质量进行综合评分,由 15 个共有峰因子的载荷向量及特征值计算得到 15 个因

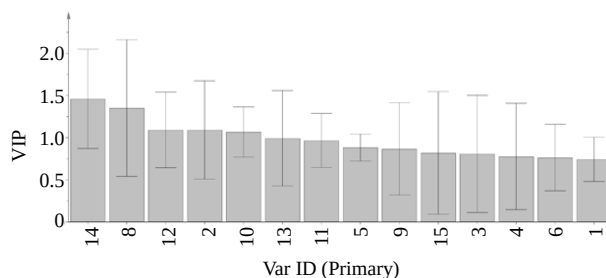


图 6 艾纳香样品 OPLS-DA 模型中 14 个色谱峰的 VIP
Fig. 6 VIP of 14 chromatographic peak in OPLS-DA model of *B. balsamifera* samples

子的特征向量, 以特征向量为系数构建 4 个主成分的线性方程 $F_1=0.286 X_1+0.314 X_2+0.291 X_3+0.301 X_4+0.350 X_5+0.290 X_6-0.090 X_7-0.005 X_8+0.254 X_9+0.283 X_{10}+0.290 X_{11}+0.268 X_{12}+0.268 X_{13}+0.017 X_{14}+0.237 X_{15}$; $F_2=-0.320 X_1+0.01 X_2-0.312 X_3-0.294 X_4-0.136 X_5-0.316 X_6-0.163 X_7+0.264 X_8+0.366 X_9+0.104 X_{10}+0.246 X_{11}+0.059 X_{12}+0.365 X_{13}+0.151 X_{14}+0.366 X_{15}$; $F_3=0.022 X_1-0.267 X_2-0.023 X_3-0.025 X_4-0.001 X_5+0.096 X_6+0.543 X_7-0.064 X_8+0.211 X_9-0.180 X_{10}+0.151 X_{11}-0.155 X_{12}+0.180 X_{13}-0.636 X_{14}+0.240 X_{15}$; $F_4=0.154 X_1+0.147 X_2+0.030 X_3+0.090 X_4+0.161 X_5+0.190 X_6+0.028 X_7+0.503 X_8+0.120 X_9-0.395$

$X_{10}-0.234 X_{11}-0.540 X_{12}+0.028 X_{13}+0.258 X_{14}+0.211 X_{15}$ 。 $X_1 \sim X_{15}$ 为指纹图谱共有峰相对峰面积, 根据特征值 $\lambda_1=6.769$, $\lambda_2=2.939$, $\lambda_3=1.397$, $\lambda_4=1.330$, 得综合得分评价方程 $F=AF_1+BF_2+CF_3+DF_4=0.544F_1+0.236F_2+0.112F_3+0.107F_4$, 其中 $A=\lambda_1/(\lambda_1+\lambda_2+\lambda_3+\lambda_4)$, $B=\lambda_2/(\lambda_1+\lambda_2+\lambda_3+\lambda_4)$, $C=\lambda_3/(\lambda_1+\lambda_2+\lambda_3+\lambda_4)$, $D=\lambda_4/(\lambda_1+\lambda_2+\lambda_3+\lambda_4)$ 。综合得分越高表示单个药材样品整体质量越好, HN-6+海南省琼中县营根镇+, HN-4+海南琼中县中平镇+, HN-3+海南琼中县中平镇+是综合得分前 3 的样品, 也是 HCA 和 PCA 中成分含量差异比较大的样品, 4 份广东产样品综合得分也比较高, 列居前 10 位, 具体综合质量评分情况见表 4。

表 4 34 批艾纳香样品主成分因子得分及排序

Table 4 Main component factor score and ranking of 34 batches of *B. balsamifera* samples

编号	F_1	F_2	F_3	F_4	综合得分	排名
GD-1	1.169	1.781	-4.233	2.449	0.843	5
GD-2	1.227	1.225	-3.151	2.133	0.832	6
GD-3	1.238	1.475	-3.878	2.458	0.850	4
GD-4	0.923	1.306	-2.774	1.828	0.695	7
GX-1	1.258	0.569	-3.712	2.458	0.665	8
GX-2	0.422	0.406	-1.739	1.280	0.267	29
GX-3	0.733	0.264	-1.058	1.041	0.454	15
GX-4	0.600	1.632	-6.016	2.923	0.349	22
GX-5	0.882	0.039	-2.200	1.732	0.427	18
GX-6	0.803	0.615	-3.204	2.224	0.461	13
GX-7	0.237	0.335	-0.924	0.957	0.207	33
GX-8	0.467	0.474	-2.229	1.419	0.268	27
GX-9	0.561	1.218	-3.001	1.715	0.439	17
GX-10	0.391	0.002	0.488	0.491	0.321	23
GX-11	0.365	0.375	-1.394	1.052	0.243	31
GX-12	0.414	0.586	-2.562	1.539	0.241	32
GZ-1	0.446	-0.011	-0.367	0.735	0.278	26
GZ-2	1.297	-0.947	-0.071	1.312	0.615	10
GZ-3	0.716	-0.206	0.645	0.423	0.459	14
GZ-4	0.598	-0.216	0.512	0.464	0.382	20
GZ-5	0.146	0.121	0.370	0.274	0.179	34
GZ-6	0.309	0.346	-0.010	0.604	0.313	24
GZ-7	0.875	0.187	-1.214	1.252	0.518	12
GZ-8	0.356	0.511	-1.382	1.011	0.268	28
GZ-9	0.450	0.673	-1.290	1.477	0.417	19
HN-1	0.304	0.178	0.548	0.098	0.280	25
HN-2	0.514	-0.025	0.669	0.181	0.368	21
HN-3	2.170	-1.034	1.000	1.019	1.158	2
HN-4	1.948	-0.771	1.093	0.847	1.091	3
HN-5	0.802	0.607	0.520	0.178	0.657	9
HN-6	2.016	1.157	1.463	0.721	1.612	1
HN-7	0.397	-0.148	0.255	0.436	0.256	30
HN-8	0.716	0.292	0.410	0.443	0.552	11
HN-9	0.626	0.653	-1.216	0.796	0.444	16

2.5 不同产地样品含量测定

在艾纳香指纹图谱建立的基础上,发现经上述色谱条件进样检测,指认的 5 个色谱峰 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素、sakuranrtin 色谱峰均能达到很好地分离效果。根据进样结果依次记录 5 个指认峰峰面积,计算其含量。

利用 IBM SPSS 19.0 统计软件对含量测定结果进行分析,发现 4 个产区 5 个成分样本量不满足正态性检验,故采用非参数独立样本 Kruskal-Wallis 检验进行不同产区含量差异分析,并借助 GraphPadPrism7.0 软件数据绘图工具做差异分析箱式图(图 7)。结果显示 5 个成分中 3,3',5,7-四羟基-

4'-甲氧基二氢黄酮、圣草酚、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮和 sakuranrtin 均以贵州产整体含量较高,艾纳香素以海南产整体含量较高;3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮贵州产区与其他 3 个产区具有一定差异($P<0.01, 0.05$),3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮和艾纳香素贵州产区与广西产区具有显著性差异($P<0.01$),sakuranrtin 在 4 个产区中没有差异。由于在指纹图谱分析结果中 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮(7 号峰)作为特征峰,其相对峰面积值为 1,在变量权重重要性排序没有得到体现^[17]。根据 4 个产区图谱峰面积以及含量测定结果可以看出该峰是区分 4 个产区的一个重要成分之一。

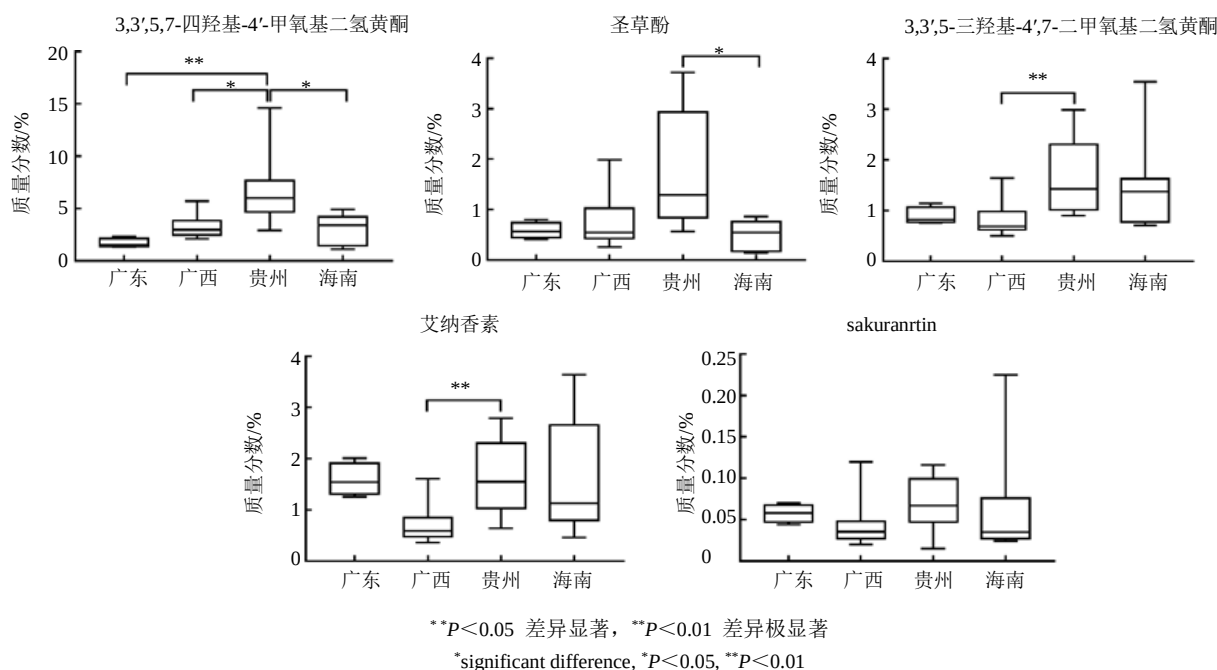


图 7 4 个产区艾纳香样品中 5 个成分的含量比较

Fig. 7 Content comparison of five components in *B. balsamifera* samples from different regions

3 讨论

本实验比较不同提取溶剂(乙醇、甲醇、90%甲醇、75%甲醇和 50%甲醇)对艾纳香样品色谱峰的影响,结果显示甲醇作为溶剂的色谱峰信息量多于乙醇,不同比例的甲醇提取比乙醇提取部分色谱峰响应值更高,但因 50%和 75%提取的在同一方法下色谱图中 32~34 min 时基线不稳定,最终选择 90%甲醇作为提取溶剂。采用二极管阵列检测器对艾纳香样品进行全波长扫描,比较了不同波长下色谱图的峰数目与分离度,结果发现采用 285 nm 作为检测波长选用样品色谱峰数目较多且分离度良

好。同时对进样色谱条件包括梯度洗脱程序、柱温、进样量、流动相磷酸水的 pH 值进行了考察,综合各种因素,最终梯度洗脱条件确定为:柱温 35 ℃;体积流量 0.9 mL/min;进样量 10 μL,流动相为 0.5%磷酸水-乙腈,梯度洗脱程序见“2.1”项。

本研究采用高效液相色谱法,建立了 34 批 4 个产区的艾纳香药材 HPLC 化学指纹图谱,结果显示 4 个产区药材相似度在 0.433~0.977,尤其海南相似度偏低,其次是贵州,广东和广西普遍具有较高相似度。4 个产区艾纳香药材在化学组分和含量上存在差异,如广东 4 个样品在 17~19 min 这个较

短时间段完全没有色谱峰信息,但是其他3个产区在这个时间段里明显的检测到了色谱峰信号,且表现出峰面积的不同。这种差异可能是由于产区因素导致,但也有可能是其他因素如采收时间、种植技术等导致某些化学成分含量过低无法达到仪器检测限而造成组分以及含量差异,或者这些因素直接导致某些产区样品缺失了某些成分,这都有待进一步的研究和探索,而差异和不稳定性的存在也说明艾纳香药材有待进一步加强质量控制和优良种质资源育种的必要性。

为了进一步寻找不同产区艾纳香样品的差异性成分,采用聚类分析、PCA分析和OPLS-DA分析等化学模式识别方法,对4个产区艾纳香样品进行分析比较。结果表明,基于指纹图谱15个共有峰相对峰面积数据,HCA和PCA分析发现4个产区差异区分不是很明显,但海南产艾纳香样品自身质量存在较大差异。通过OPLS-DA分析可以将海南、广东样品同贵州、广西进行一定的区分,不同产区样品偏向分布不同的象限,贵州和广西大部分样品可以聚为一类,这和HCA结果一致。贵州和广西地区毗邻,环境气候条件具有更多的相似性,均属于亚热带气候区,广东和广西地区毗邻,广东是亚热带和热带混合气候,而海南则与其他3个产区独立开来,完全属于热带气候,从分析结果也可以看出海南产区的样品存在更大的差异性。通过变量权重要性排序及多成分含量测定发现共有峰14、8(圣草酚)、12、2、10、7号峰(3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮),这些成分可以作为区分和鉴别不同产区艾纳香药材质量的控制指标,4个未知差异成分本课题组后续将利用Q-TOF/MS对未知成分进行定性,从而明确可识别不同产区艾纳香药材的差异成分,以期评价艾纳香药材的质量一致性提供更为全面地参考。虽然海南样品自身存在较大差异,但是其艾纳香单株样品表现出了较佳的质量评分,综合质量评分中前3名为海南省琼中县的样品,具备了选育出优良艾纳香单株的可能性,可为艾纳香品种选育和分株扩繁提供依据。在前期课题组提取分离艾纳香单体成分的基础上通过对照品指认并定量测定了5个二氢黄酮类单体成分,这5个成分均是艾纳香中的重要活性成分,具有抑菌^[15]、抗肿瘤^[20]、抗氧化^[21]等药理作用,在艾纳香整体药材质量评价中可考虑作为黄酮类指标性成分。

综上所述,艾纳香药材根据产区不同,在成分的

组分上以及含量或比例关系上存在显著差异。指纹图谱作为一种有效的中药质量控制模式,在色谱峰未明确为何种成分的情况下,结合化学模式识别技术仍能给出充分、可靠的信息,再佐以多成分含量测定可用于中药材质量评价^[22]。本研究所建立的HPLC指纹图谱及多成分定量方法具有良好的精密度、重复性和稳定性,简便可靠,分析结果可为艾纳香药材质量控制和优良种质资源选育提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 官玲亮,庞玉新,王丹,等. 中国民族特色药材艾纳香研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 695-698.
- [2] 陈宝雯,钱一鑫,周黎亚,等. GC法同时测定艾纳香油中6种成分的含量 [J]. 中国药房, 2019, 30(22): 3049-3052.
- [3] Fan Z W, Pang Y X, Wang K, et al. *Blumea balsamifera* oil for the acceleration of healing of burn injuries [J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 17166-17179.
- [4] 谢雪艳,李天珍,王万林,等. 不同产源艾纳香油化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1069-1076.
- [5] 张颖,李翔,宋婷,等. 艾纳香挥发油的化学成分及抗菌活性研究 [J]. 北京农业, 2015(17): 224-226.
- [6] 严启新,谭道鹏,康晖,等. 艾纳香中的黄酮类化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 86-89.
- [7] 胡永,李亚男,李霞,等. 艾纳香中的黄酮类化合物及其抗氧化与 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 1898-1903.
- [8] 许实波,胡莹,林永成,等. 艾纳香素对护肝及血小板聚集的作用 [J]. 中山大学学报论丛, 1994(6): 48-53.
- [9] Saewan N, Koysomboon S, Chantapromma K. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(6): 1018-1025.
- [10] 谢小丽,陈振夏,庞玉新,等. 艾纳香资源研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(12): 2024-2029.
- [11] 卫亚丽,汤洪敏,莫珊凤,等. 不同产地黔艾纳香中左旋龙脑含量测定 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 278-280.
- [12] 黄永林,文永新,赵志国,等. RP-HPLC法测定艾纳香中艾纳香素和二氢黄酮醇含量 [J]. 广西科学, 2007, 14(2): 140-142.
- [13] 于福来,黄梅,庞玉新,等. 栽培艾纳香单株左旋龙脑和总黄酮含量变异分析 [J]. 中国现代中药, 2014,

- 16(8): 640-644.
- [14] 顾岑, 王华磊, 赵致, 等. 植物生长调节剂对苗药艾纳香产量和品质的影响 [J]. 中药材, 2017, 40(5): 1039-1042.
- [15] 王鸿发, 元超, 庞玉新. 艾纳香中的黄酮类化合物及其抗菌活性 [J]. 热带作物学报, 2019, 40(9): 1810-1816.
- [16] 陈欣, 高萌, 罗小泉, 等. 不同产地枳壳药材中 12 种有效成分的主成分分析和判别分析 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3433-3437.
- [17] 周欣, 张琳, 毛婵, 等. 基于化学计量学方法结合正交偏最小二乘判别分析的陈皮饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2194-2200.
- [18] 田双双, 赵晓梅, 刘珊珊, 等. 基于 UPLC 特征图谱及萜类成分含量测定的泽泻产地差异研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1545-1557.
- [19] 黄梅, 陈振夏, 于福来, 等. 裸花紫珠主要化学成分分布及其动态积累研究 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1308-1315.
- [20] 张亚琛. 彝族“黄药”黄酮类化学成分分离、鉴定及抗肺癌活性研究 [D]. 北京: 中央民族大学, 2018.
- [21] 吕凤, 杜倩, 奚鑫, 等. 圣草酚药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5907-5912.
- [22] 杨玉莹, 张丹丹, 罗心遥, 等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地青钱柳质量 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 1082-1088.

[责任编辑 时圣明]