

## 技术方法

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000043

## 水黄花药材高效液相色谱指纹图谱及模式识别

夏玉吉<sup>1</sup>, 鲍家科<sup>2</sup>, 郑丽会<sup>1</sup>, 许乾丽<sup>1</sup>

(1. 贵州省食品药品检验所中药(民族药)室, 贵阳 550004; 2. 贵州省药品审评认证中心, 贵阳 550004)

**【摘要】目的:**研究水黄花药材高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)指纹图谱及模式识别方法。**方法:**采用 HPLC, 以贵州不同产地、不同采收期的水黄花药材为对象, 对 15 批药材进行指纹图谱研究, 运用聚类分析对指纹图谱进行模式识别研究。**结果:**15 批样品中有 13 个共有峰, 15 批药材相似度较高, 色谱峰强度不同是药材的主要差别。通过聚类分析将 15 批样品按采收期不同分为 2 类。**结论:**该方法能很好分离水黄花的各类成分, HPLC 指纹图谱具有良好的稳定性、重复性, 可用于水黄花药材的质量控制。

**【关键词】**水黄花; 指纹图谱; 相似度; 聚类分析**【中图分类号】**R282.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-10-14

## High performance liquid chromatography fingerprint chromatogram and chemical pattern recognition method of Euphorbia chrysocoma Levl.etVant.

Xia Yuji<sup>1</sup>, Bao Jiak<sup>2</sup>, Zheng Lihui<sup>1</sup>, Xu Qianli<sup>1</sup>(1. Guizhou Institute for Food and Drug Control Department of Traditional Chinese Medicine(Ethnomedicine);  
2. Guizhou Center for Drug Evaluation)

**【Abstract】Objective:** To study the high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint chromatogram and chemical pattern recognition method of Euphorbia chrysocoma Levl.etVant. **Methods:** Fifteen batches of Euphorbia chrysocoma Levl.etVant. samples were harvested at different time periods in different producing areas of Guizhou and were carried out to gain fingerprints by HPLC. Cluster analysis was conducted to do chemical pattern recognition of fingerprints of Euphorbia chrysocoma Levl.etVant.. **Results:** Fingerprints of 15 batches of samples demonstrated 13 characteristic peaks. Chromatographic profiles of 15 batches of samples were similar; major differences resulted from intensity of chromatographic peaks. Samples were grouped into 2 types based on the harvest time. **Conclusion:** Components of Euphorbia chrysocoma Levl.etVant. can be well separated on HPLC chromatogram. HPLC fingerprint chromatogram has good repeatability and stability and can be used for quality control of Euphorbia chrysocoma Levl.etVant.

**【Key words】**Euphorbia chrysocoma Levl.etVant.; fingerprint chromatogram; similarities; cluster analysis

水黄花为大戟科植物水黄花的全草, 又名刮金板、黄苞大戟、大狼毒等。本品为贵州苗族民间的常用药, 其性寒、味苦、入热经, 主要有泻下、逐水、利尿等功效, 主治水腫、水腫、疥癬和小兒黃水瘡等<sup>[1]</sup>。主要分布于湖北、广西、四川、贵州、云南等省区。水黄花基础研究少, 仅限于对其化学成分简单研究, 目前从水黄花中提取到的化学成分主要有萜类、甾体类、香豆素<sup>[2]</sup>、蒽醌及酚类化合物<sup>[3]</sup>。水黄花系《中华本草》苗药卷收载, 现行质量标准尚未收载。

就水黄花目前质量分析研究的现状, 本课题以产自贵州不同地区不同采收季节的 15 批水黄花药材为样品, 建立了水黄花高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)指纹图谱对照图谱, 同时, 在建立指纹图谱基础上构建了有关识别模式, 以此对不同采收季节的水黄花药材进行质量评价。

## 1 仪器与材料

## 1.1 仪器

日本岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪 (SPD-M20A 二极管阵列检测器、CBM-20A 系统控制器、CTO-20AC 柱温箱、LC-20AT 泵、SIL-20A 自动进样器、LC2000 色谱数据工作站), XS205 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), CH-300 型超声波清洗机 (北京创新德超声电子研究所), DK-

作者介绍: 夏玉吉, Email: 1392192077@qq.com,

研究方向: 中药成分分析。

通信作者: 鲍家科, Email: bjk2005@163.com。

基金项目: 贵州省中药现代化科技产业资助项目 (编号: [2008]5002)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000043.html>

98-11A 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),中药材粉碎机(浙江温岭市林大机械有限公司)。

## 1.2 试药

水黄花药材 15 批,均由贵阳中医学院陈德媛研究员鉴定为大戟科植物水黄花的全草。药材来源见表 1。槲皮素对照品(批号 100081-200406)、金丝桃苷对照品(批号 11521-200303)、槲皮苷对照品(批号 111538-200403)(由中国药品生物制品检定所提供)。乙腈为色谱纯,甲醇为色谱纯、分析纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

取各批药材粉末(过 4 号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加乙醇 25 ml,水浴回流 60 min,放冷、滤过、合并滤液、蒸干、残渣加乙醇溶解,转移至 10 ml 量瓶中,并加乙醇至刻度、摇匀,作为供试品溶液。经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,得供试品溶液。

### 2.2 对照品溶液的制备

取金丝桃苷对照品适量,精密称定,至于量瓶中,加乙醇制成 0.05 mg/ml 的溶液;取槲皮苷对照品适量,精密称定,至于量瓶中,加乙醇制成 0.1 mg/ml 的溶液;取槲皮素对照品适量,精密称定,至于量瓶中,加乙醇制成 0.1 mg/ml 的溶液。分别取上述对照品溶液,过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜,即得对照品溶液。

### 2.3 色谱条件

色谱柱:Diamosil C18 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱,0~6 min, 17% A, 6~30 min, 17% A  $\rightarrow$  16% A, 30~35 min, 16% A  $\rightarrow$  20% A, 35~50 min, 20% A;检测时间:80 min;柱温:30  $^{\circ}$ C;流速:1.0 ml/min;进样量:10  $\mu$ l;检测波长:360 nm。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 精密称取水黄花 1 号药材粉末,按 2.1 中的方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录 HPLC 图谱,以各共有峰的相对保留时间和相对峰面积为指标计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),结果 RSD 均小于 5%。运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》,采用中位数法计算相似度,结果相似度均大于 0.959。上述实验结果表明该方法精密度良好。

2.4.2 重复性实验 精密称取水黄花 1 号药材粉末 6 份,按 2.1 中的方法制备供试品溶液,记录 HPLC 图谱,以各共有峰的相对保留时间和相对峰面积为指标计算 RSD,结果 RSD 均小于 5%。运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》,采用中位数法计算相似度,结果相似度均大于 0.975。上述试验结果表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性实验 精密称取水黄花 1 号药材粉末 1 份,按 2.1 中的方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、24 h 检测,以各共有峰的相对保留时间和相对峰面积为指标计算 RSD,结果 RSD 均小于 5%。运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系

统 2004A 版》,采用中位数法计算相似度,结果相似度均大于 0.971。上述试验结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.5 HPLC 指纹图谱的建立及模式识别分析

2.5.1 HPLC 指纹图谱的建立 将 15 批水黄花药材的供试品溶液按 2.3 中色谱条件进样,记录 HPLC 图谱,详细比较了 15 批样品的色谱图,确定了 13 个共有峰,13 个共有峰的峰面积之和占总峰面积的 96.41%以上,符合指纹图谱相关规定。

2.5.2 共有峰的相对保留时间和相对面积 根据 15 批样品的测定结果,以 9 号峰为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明,15 批水黄花指纹图谱共有峰相对保留时间的 RSD 较小,而相对峰面积的 RSD 较大,说明水黄花药材指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,但各成分之间含量相差较大<sup>[4]</sup>。

2.5.3 相似度计算<sup>[5]</sup> ①运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》,采用中位数法进行多点校正自动匹配后生成指纹图谱共有模式见图 1,并以共有模式为参照图谱,计算 15 批样品的相似度,相似度计算结果见表 1。15 批水黄花 HPLC 指纹图谱叠加见图 2。②利用 13 个共有峰峰面积值,以相关系数为测度,计算各样品的相似度,对样品的指纹图谱进行相似度评价,相似度计算结果见表 1。通过相似度评价结果可知,2 种计算方法所得结果基本一致,即 15 批样品相似度除 2 号样品低于 0.8 以外,其余 14 批样品相似度均大于 0.8,表明各批样品相似度良好。

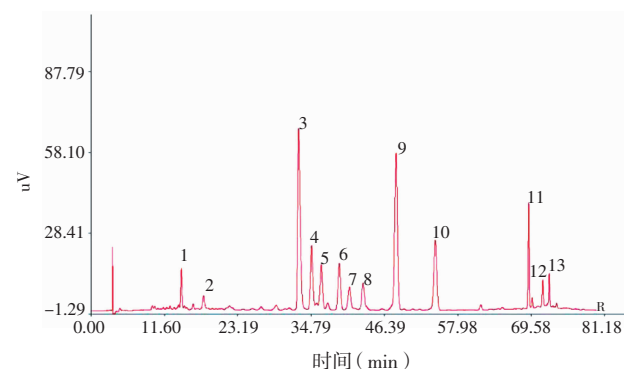


图 1 水黄花 HPLC 指纹图谱共有模式

Fig.1 Common pattern of *Euphorbia chrysocoma* Levl.et Vant. HPLC fingerprint chromatograms

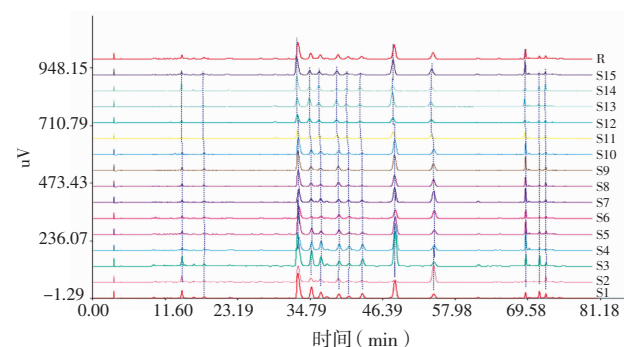


图 2 15 批水黄花药材 HPLC 图谱叠加图

Fig.2 HPLC overlapping chromatograms of 15 batches of *Euphorbia chrysocoma* Levl.et Vant.

表 1 水黄花药材来源及相似度评价结果

Tab.1 Source and similarities of Euphorbia chrysocoma

| 样品<br>编号 | 产地        | 收集日期        | Levl.etVant.   |          |
|----------|-----------|-------------|----------------|----------|
|          |           |             | 相似度软件          | SPSS软件   |
|          |           |             | 与对照指纹<br>图谱相似度 | 相关系<br>数 |
| 1        | 贵阳市花溪高坡   | 2010年 10 月  | 0.951          | 0.947    |
| 2        | 贵阳市乌当水田   | 2011 年 4 月  | 0.706          | 0.550    |
| 3        | 贵阳市花溪高坡   | 2011 年 6 月  | 0.961          | 0.950    |
| 4        | 贵州清镇市麦格乡  | 2011 年 7 月  | 0.941          | 0.848    |
| 5        | 贵州清镇市五里桥乡 | 2011 年 6 月  | 0.987          | 0.982    |
| 6        | 贵阳市花溪久安   | 2011 年 6 月  | 0.961          | 0.924    |
| 7        | 贵阳市乌当新场乡  | 2011 年 7 月  | 0.961          | 0.915    |
| 8        | 贵阳市金阳新区   | 2011 年 7 月  | 0.983          | 0.975    |
| 9        | 贵阳市阿哈水库   | 2011 年 7 月  | 0.991          | 0.986    |
| 10       | 贵阳市机修厂    | 2011 年 8 月  | 0.998          | 0.989    |
| 11       | 贵阳市百花湖    | 2011 年 8 月  | 0.980          | 0.971    |
| 12       | 贵州凯里市郊区   | 2011 年 9 月  | 0.949          | 0.949    |
| 13       | 贵州黔东南州麻江县 | 2011 年 9 月  | 0.940          | 0.905    |
| 14       | 贵州都匀市郊区   | 2011 年 1 月  | 0.874          | 0.816    |
| 15       | 贵州织金县     | 2011 年 10 月 | 0.994          | 0.989    |

2.5.4 聚类分析 以 15 批水黄花药材进行指纹图谱研究, 获得 13 个共有峰, 得到  $15 \times 13$  阶原始数据矩阵, 以样品编号为变量, 运用 SPSS 18.0 软件对其进行聚类分析, 采用中位数法, 利用欧式距离作为样品的测度, 15 个样品基本可分为 2 大类: 样品 2 号为第 1 大类, 其余的样品为第 2 大类。聚类分析结果见图 3。

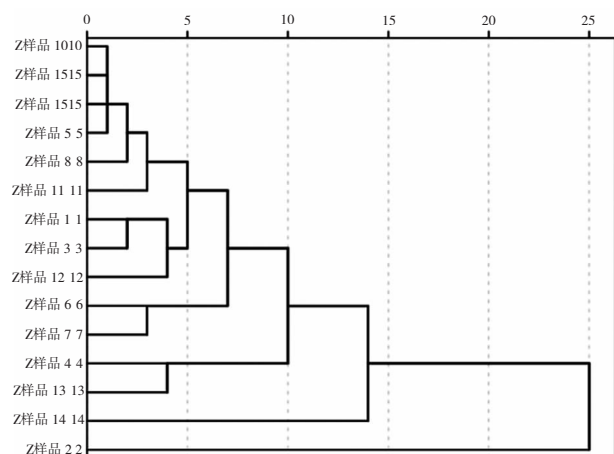


图 3 15 批样品聚类分析结果

Fig.3 Cluster analysis of 15 batches of samples

### 3 讨 论

本实验建立了水黄花药材 HPLC 指纹图谱研究方法, 标定了 13 个共有峰, 通过对照品和样品 HPLC-DAD 指纹图谱中色谱峰的紫外光谱图及保留时间对比可知, 4 号峰为金丝桃苷, 9 号峰为槲皮苷, 12 号峰为槲皮素。

聚类分析可作为相似度评价方法的有益补充, 以更为客观地评价中药内在质量的真实性和一致性<sup>[9]</sup>。本文运用聚类分析对 15 批水黄花 HPLC 指纹图谱进行分析, 分析结果与相似度评价软件计算结果一致, 即 2 号样品为一类, 其余 14 批样品为另一类 (其中 14 号样品与其余批次样品又存在较大差异)。分析原因可能是 2 号、14 号药材的采收期不同, 两批样品的采收期分别为 4 月份、1 月份, 其余 13 批样品均采自 6~10 月份, 说明在夏秋两季采收样品与共有模式相似度较好。

因此本课题所建立的 HPLC 指纹图谱共有模式可作为水黄花药材质量综合评价的参考方法。为水黄花药材的比较鉴定提供新的方法, 也为深入研究其化学成分奠定了一定的基础, 同时还为其采收季节提供一定参考依据。

### 参 考 文 献

- [1] 邱德文, 杜江, 夏同珩. 中华本草草药卷彩色图谱[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2006: 109.
- [2] 史海明. 三种药用植物—月腺大戟、水黄花和水团花的化学成分研究[D]. 南京: 中国药科大学, 2004.
- [3] 姜春勇. 两种大戟属植物中的化学成分研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2010.
- [4] 王燕, 鲍家科, 金杨, 等. 西南鬼灯檠的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 57.
- [5] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 282-287.
- [6] 黄勇, 郑林, 王爱民, 等. 贵州产荭草药材指纹图谱的模式识别研究[J]. 中成药, 2008, 30(7): 945.

(责任编辑: 唐秋姗)