

# 狼毒大戟二萜类成分 HPLC 指纹图谱及聚类分析

洪 博<sup>1</sup>, 李文静<sup>1</sup>, 刘树民<sup>2</sup>, 刘吉成<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>齐齐哈尔医学院药学院医药科学研究中心, 齐齐哈尔 161000;

<sup>2</sup>黑龙江中医药大学基础医学院中药教研室, 哈尔滨 150040

**摘要:**为建立狼毒大戟药材的特征图谱, 科学评价其质量, 本文采用高效液相色谱法, 乙腈-水梯度洗脱, 测定了 11 批不同来源的狼毒大戟样品二萜类化合物, 通过相似度分析建立了狼毒大戟提取物的高效液相指纹图谱, 并对 11 批药材进行系统聚类分析。本文采用乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 检测波长: 230 nm, 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 10  $\mu$ L, 柱温: 30  $^{\circ}$ C。相似度评价结果显示 11 批不同产地的狼毒大戟相似度均高于 0.9, 并对 11 批样品建立共有模式, 确定了 23 个特征共有峰, 聚类分析结果将狼毒大戟样品分为 2 类, 与药材产地相关。本文所建立狼毒大戟的指纹图谱方法简便、可靠, 可作为狼毒大戟药材的基源鉴定参考方法。

**关键词:**狼毒大戟; HPLC 指纹图谱; 相似度; 聚类分析

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.012

## HPLC Fingerprinting and Cluster Analysis of Diterpenoids Constituents in *Euphorbia fischeriana*

HONG Bo<sup>1</sup>, LI Wen-jing<sup>1</sup>, LIU Shu-min<sup>2</sup>, LIU Ji-cheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Qiqihar Medical University, Pharmacy School, Medical Science Research Center, Qiqihar 161000, China; <sup>2</sup>Heilongjiang University of Chinese Medicine, Basic Medical Sciences School, Chinese Materia Medica Department, Harbin 150040, China

**Abstract:** This study was aimed to establish the method of fingerprint analysis of chemical constituents of *Euphorbia fischeriana* by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) and hence to control its quality. A mixed mobile phase of water and acetonitrile in a gradient elution mode was applied to determine diterpenoid compounds in 11 batches of *E. fischeriana*. The flow rate was 1.0 mL/min; the UV detection wavelength was 230 nm; the injection volume was 10  $\mu$ L; the column temperature was 30  $^{\circ}$ C. In addition, classification of different *E. fischeriana* samples was obtained using systematic cluster method. The analysis results of Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint suggested that the degree of similarity of the 11 batches of *E. fischeriana* samples were over 0.9. The HPLC chromatographic fingerprint of chemical constituents in the 11 batches of *E. fischeriana* was established, which showed 23 characteristic common peaks. The cluster analysis results indicated that the 11 batches of samples were classified into 2 classes, which was related to the origins of herbs. The developed HPLC method can be used to identify the origins of *E. fischeriana* herbs and to control its quality.

**Key words:** *Euphorbia fischeriana*; HPLC fingerprint; similarity; cluster analysis

狼毒大戟 (*Euphorbia fischeriana* Steud.) 又名东北狼毒、白狼毒、猫眼草, 为大戟科植物狼毒大戟的根。在中药中也作狼毒使用, 其味辛, 性平, 有毒, 具有祛痰逐水、破积杀虫等功效, 用于治疗水肿腹胀、咳嗽、气喘等<sup>[1]</sup>。目前对狼毒大戟药材的研究多集中在化学成分中提取和分离, 主要有二萜、三萜、鞣质、甾醇、葱醌类等<sup>[2-5]</sup>。其中二萜类化合物为主要

活性成分, 经药理学研究证明其有抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>, 同时也具有细胞毒及刺激性等毒性作用<sup>[7,8]</sup>。关于狼毒大戟的质量标准研究, 在 2010 年版《中国药典》<sup>[9]</sup> 收载有“狼毒”项下有性状、显微和薄层鉴别等质控项目; 大部分文献采用测定狼毒大戟中活性成分岩大戟内酯 B、狼毒乙素等含量测定的方法进行质量评价。随着分析手段的发展, 中药指纹图谱研究以其充分的化学特征作为质量控制模式, 可以综合反映药材中各主要成分及其相对含量, 从而提供更加丰富的质量评价信息。

狼毒大戟药材中含量较高的二萜类化合物,临床上长期应用于消炎、抗结核、抗肿瘤等治疗。本文以狼毒大戟中二萜类化合物,岩大戟内酯 B(药理研究已表明其有明显的抗癌活性)<sup>[2,10]</sup>为研究对象,在已明确二萜类成分最佳提取工艺基础上,采用二元梯度洗脱模式,建立了狼毒大戟药材二萜类成分的 HPLC 特征图谱和质量评价方法,未见文献对此类成分的特征图谱进行研究。本文有针对性地针对狼毒大戟药材中二萜类成分进行分离、分析,方法可靠、重复性好,操作简便,为给狼毒大戟药材的合理使用和基源选育提供理论依据,进一步开发狼毒大戟的药用功能提供一定的质量保证。

## 1 仪器及材料

### 1.1 仪器

Waters 2695 四元泵全自动进样高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),含 UV2489 检测器;柱温箱;Waters Empower 色谱工作站;LAC214 型电子分析天平(常熟市百灵天平仪器厂);HHS 型电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);KQ-3200E 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 版)软件。

### 1.2 试药

岩大戟内酯 B 对照品为本实验室自制,经波谱学方法鉴定结构,并由色谱法确定其纯度为 99.2%。11 批狼毒大戟药材来源于黑龙江齐齐哈尔(批号:120323、111229、120225)、黑龙江哈尔滨(批号:120818、120527、110723)、吉林长春(批号:120114、120123)、河北保定(批号:120312)、内蒙古(批号:110913)、黑龙江牡丹江(批号:120720),经齐齐哈尔医学院药学院中药学教研室郭丽娜教授鉴定为大戟科大戟属植物狼毒大戟的干燥根。

分析用甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Merck 公司),药材提取用无水乙醇等试剂为分析纯购自山东禹王试剂有限公司,液相用水为杭州娃哈哈纯净水。

## 2 实验方法

### 2.1 色谱条件

Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 15% A; 10 ~ 20 min, 15% ~ 50% A; 20 ~ 30 min, 50%

~ 60% A; 30 ~ 40 min, 60% ~ 70% A; 40 ~ 50 min, 70% ~ 90% A),平衡时间 5 min。检测波长:230 nm;柱温:30 °C;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,理论塔板数按岩大戟内酯 B 峰计算不小于 3500。

### 2.2 对照品溶液和供试品溶液的制备

精密称取岩大戟内酯 B 对照品 1.0 mg,置 1 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得对照品储备液。

根据前期对二萜类成分提取方法的正交实验结果,确定供试品溶液的提取方法,取狼毒大戟粉末(过 4 号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 90% 乙醇 20 mL,超声处理(功率 300 W,频率 35 kHz)30 min,提取温度 70 °C,放冷后补足减少的重量,摇匀,滤过,精取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液即得供试品溶液。

### 2.3 方法学验证

#### 2.3.1 精密度的试验

精密吸取同一供试品溶液 10 μL,连续进样 6 次,按色谱条件测定,以 21 号色谱峰的保留时间和峰面积为参照,选择 23 个共有峰进行比较,结果表明,各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.52%,各共有峰相对峰面积 RSD < 1.25%,表明仪器的精密度良好,符合指纹图谱要求。

#### 2.3.2 重复性的试验

取同一批狼毒大戟粉末 6 份,按照供试品溶液制备方法平行操作供试品溶液,分别进样,按色谱条件测定指纹图谱,对 23 个共有峰的保留时间和峰面积进行比较,以岩大戟内酯 B 为参照峰,计算相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值,结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD < 2.11%,各共有峰相对峰面积 RSD < 3.05%,表明该方法重复性良好。

#### 2.3.3 稳定性的试验

取同一供试品溶液适量,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 检测指纹图谱,测得 23 个共有峰的保留时间和峰面积,以岩大戟内酯 B 为参照峰,计算相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值,结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD < 1.23%,各共有峰相对峰面积 RSD < 2.42%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.4 样品测定

以《中药注射剂指纹图谱的技术研究》为指导,将 11 批狼毒大戟样品按供试品项下方法制备,考虑

到各样品中均有 21 号色谱峰且含量较高,其保留时间及峰形稳定,分离度良好,故以此峰作为参照峰,记录色谱图。将 11 批样品色谱图 HPLC 色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》,生成狼毒大戟对照图谱。再以对照图谱为参照图谱,计算相似度。以共有峰峰面积为变量,运用 SPSS 软件对个样品进行聚类分析,得出树状图。

### 3 实验结果

#### 3.1 狼毒大戟二萜类成分指纹图谱的建立

按照供试品制备方法制备 11 批不同狼毒大戟样品按供试品溶液,按照色谱条件进行测定,记录色

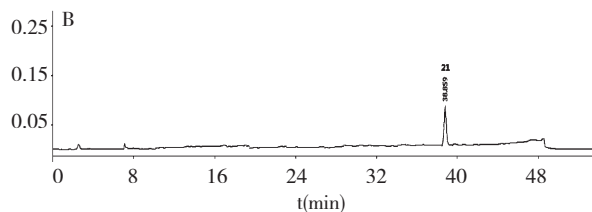
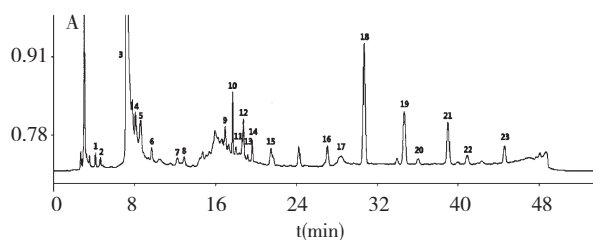


图 1 狼毒大戟二萜类化合物提取物 (A) 及岩大戟内酯 B(B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of diterpenoid extract of *E. fischeriana* (A) and jolkinolide B (B)

#### 3.2 指纹图谱的相似度计算

按照国家药典委员会公布的中药指纹图谱评价软件计算方法,对 11 批狼毒大戟指纹图谱进行相关技术参数的计算并建立共有模式,选取“时间窗宽度”为 0.5 min,对照图谱的生成方法为“中位数”,自动匹配后,得到样品与对照图谱的匹配图,见图 2。计算出样品与对照品谱图的相似度数据,结果见表 1。通常,相似度在 0.9 以上的判定为优质药材;相似度在 0.7~0.9 的药材质量一般;若相似度低于 0.7,则判定为伪品,本文的 11 批不同产地狼毒大戟未见伪品。由于不同产地生长环境不同,指纹图谱

相似度也有所差异。

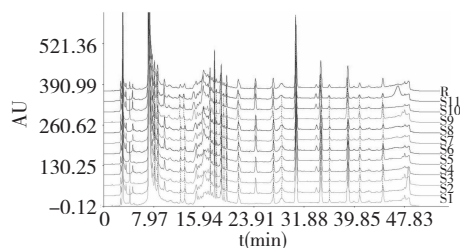


图 2 11 批不同产地狼毒大戟样品 HPLC 色谱重叠图

Fig. 2 Overlapped HPLC chromatograms of 11 batches of *E. fischeriana* samples

表 1 不同产地狼毒大戟药材相似度计算结果

Table 1 Similarities of *E. fischeriana* samples

样品号 No.	样品来源 Source	相似度 Similarity	样品号 No.	样品来源 Source	相似度 Similarity
S1	齐齐哈尔 I(120323) Qiqihar	0.965	S7	长春 I(120114) Changchun	0.988
S2	齐齐哈尔 II(111229) Qiqihar	0.989	S8	长春 II(120123) Changchun	0.985
S3	齐齐哈尔 III(120225) Qiqihar	0.967	S9	保定 I(120312) Baoding	0.931
S4	哈尔滨 I(120818) Harbin	0.982	S10	牡丹江(120720) Mudanjiang	0.984
S5	哈尔滨 II(120527) Harbin	0.964	S11	内蒙古(110913) Neimenggu	0.946
S6	哈尔滨 III(110723) Harbin	0.981			

### 3.3 系统聚类分析

将 11 批不同来源狼毒大戟药材样品的 HPLC 特征图谱各色谱峰的峰面积相对药材称样量之比<sup>[12]</sup>,即单位质量药材峰面积进行量化,得到 11 × 23 阶的数据矩阵,应用 SPSS13.0 统计分析软件,选择离差平方和法为聚类方法、欧氏距离平方法为测量距离方法进行聚类分析,得到红花药材的聚类谱系,结果见图 3。聚类谱系中,当判别条件距离  $d_i = 5$  时,S4、S5、S6 聚为一类,S1、S2、S3、S10 聚为一类,S7、S8、S9、S11 聚为一类;当判别条件距离  $d_i = 10$  时,将 11 批样品分为 2 类,第 7、8、9 和 11 批被分为一类,其余 7 批分为一类。说明不同的生长环境会导致狼毒大戟药材中化学成分的差异。

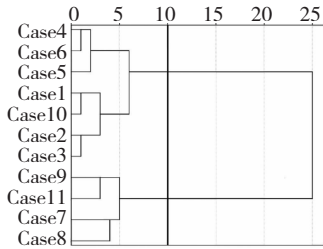


图 3 11 批狼毒大戟药材的聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram of 11 batches of *E. fischeriana* samples

## 4 讨论

聚类分析的结果显示黑龙江省产的狼毒大戟药材基源最为接近,聚为一类,药材中化学成分与产地有密切关系,进一步证明狼毒大戟为北方优质药材资源。后期本项目组将对不同产地狼毒大戟中具体化学成分进行提取、分离研究,深入探讨地域给药材具体成分带来的差别。

本文采用不同溶剂(不同比例的甲醇水、乙醇水)、不同提取方法(回流提取和超声)及提取时间(20、30、40 min)对狼毒大戟供试液提取方法进行考察,并根据指纹图谱对不同提取方法的提取液进行分析,结果表明,用 90% 乙醇作为溶剂超声提取 30 min 能够将狼毒大戟中二萜成分较完全提取出来,且方法简单可行,得到的 11 批样品的相似度较好。

本文建立的狼毒大戟二萜类成分的 HPLC 指纹图谱可靠,使用 HPLC 指纹图谱可全面得到狼毒大戟药材的二萜类成分化学信息,并利用这些化学信息可对其进行相似度计算进行有效的质量控制。

### 参考文献

- Xu SN (徐树楠), Zhu ZM (朱占民). Sheng Nong's Herbal Classic (神农本草经). Shijiazhuang: Hebei Science & Technology Press (河北科学技术出版社), 1994. 131.
- Wang HB, Chen W, Zhang YY, et al. Four new diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*. *Fitoterapia*, 2013, 91:211-216.
- Wang XY, Liu LP, Kang TG, et al. Chemical constituents of *Euphorbia fischeriana*. *Chine J Nat Med*, 2012, 10:299-302.
- Zhou TX, Bao GH, Ma QG, et al. Langduin C, a novel dimeric diterpenoid from the roots of *Euphorbia fischeriana*. *Tetrahedr Lett*, 2003, 44:135-137.
- Wang HW (王宏伟), Wang HX (王海秀), Gu YJ (顾雅静). Research progress on chemical components and action mechanism of *Euphorbia fischeriana* steud. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:1853-1856.
- Shi HM, Williams ID, Sung HH, et al. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*. *Planta Med*, 2005, 71:349-354.
- Su SL (宿树兰), Ding AW (丁安伟), Duan JA (段金殿). Progresses in studying diterpene esters structures and associated toxicity. *World Sci Tech/Mod Trad Chin Med Mater Med* (世界科学技术, 中医药现代化), 2007, 9:67-73.
- Qiao CF (乔春峰), Han QB (韩全斌), He ZD (贺震旦), et al. HPLC determination of jolkinolide A and jolkinolide B in Chinese herb medicine "Lang-du". *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26:1204-1206.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol 1, 269.
- Ma XJ, Liu YP, Zhang Y, et al. Jolkinolide B inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing the activation NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *Bioch Bioph Res Com*, 2014, 445:282-288.
- Wang X (王玺), Wang WY (王文宇), Zhang KR (张克荣), et al. Approaching the study on the similarity analysis of HPLC fingerprints spectra for traditional Chinese medicines. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20:360-366.
- Ma P (马培), Xu LJ (许利嘉), Liu YZ (刘延泽), et al. Studies on the UPLC fingerprint and quality evaluation of crude drug of *Polygonum cuspidatum*. *Chin J Exp Trad Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(2):72-77.