

苗药滚山珠 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

文敏^{1,2,3,4},周欣^{1,2,3,4},赵超^{1,2,3,4},陈华国^{1,2,3,4},龚小见^{1,2,3,4*}¹贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室;²贵州师范大学 喀斯特山地生态环境保护与资源利用协同创新中心;³贵州师范大学 贵州省药物质量控制及评价技术工程实验室;⁴贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心,贵阳 550001

摘要:利用 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别技术对滚山珠药材进行质量评价。采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以甲醇-0.1% 乙酸水溶液为流动相梯度洗脱,检测波长 254 nm,流速 0.8 mL/min,进样量 2 μL,柱温 25 °C。然后利用相似度评价、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘别分析等化学模式识别方法,对不同来源的滚山珠药材质量进行分析和评价。所建立的 HPLC 指纹图谱共识别、标定了 22 个共有峰,经鉴定其中的 1 个共有峰为酪氨酸,24 批不同来源滚山珠的相似度在 0.739~0.957。经正交偏最小二乘判别分析筛选出了导致不同批次药材质量差异的 5 个共有峰。本研究建立的滚山珠 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的方法简单、可靠,方法重复性好、专属性强,可为滚山珠的质量控制提供了依据和参考。

关键词:滚山珠;HPLC;指纹图谱;化学模式识别

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)10-1668-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.10.005

Study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Miao medicine *Prionobelum qianensis* Chen

WEN Min^{1,2,3,4}, ZHOU Xin^{1,2,3,4}, ZHAO Chao^{1,2,3,4}, CHEN Hua-guo^{1,2,3,4}, GONG Xiao-jian^{1,2,3,4*}¹Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University;²Collaborative Innovation Center for Karst Mountain Ecological Environmental Protection and Resource Utilization (Project of Education Department of Guizhou Province), Guizhou Normal University;³Guizhou Engineering Laboratory for Quality Control & Evaluation Technology of Medicine, Guizhou Normal University;⁴Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

Abstract: The HPLC fingerprints and chemical pattern recognition were studied to evaluate the quality of *Prionobelum qianensis* Chen. The chromatographic separation was performed on a Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm,5 μm). Methanol-0.1% acetic acid solution was used as mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was set at 254 nm, the flow rate was 0.8 mL/min, the injection volume was 2 μL, and the column temperature was 25 °C. The chemical pattern recognition of similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares analysis were used to analyze and evaluate the quality of *P. qianensis*. A total of 22 common peaks were identified and demarcated by HPLC fingerprint, one of them was identified as tyrosine. The results about the chemical pattern recognition showed that the similarities of those fingerprints were between 0.739 and 0.957. Furthermore, the quality difference of those *P. qianensis* was mainly caused by 5 common peaks according to the results of orthogonal partial least squares discriminant analysis. In conclusion, the HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition provide of *P. qianensis* established in this study is simple, reliable, reproducible, and specific, which provides a basis and reference for the quality control of *P. qianensis*.

Key words: *Prionobelum qianensis* Chen; HPLC; fingerprint; chemical pattern recognition

收稿日期:2021-03-22

接受日期:2021-07-12

基金项目:贵州省高层次创新人才培养项目(黔科合人才[2015]4003)

滚山珠(*Prionobelum qianensis* Chen),为泽马陆科(Zephroniidae)锯刺马陆属(*Prionobelum*)黔锯刺

*通信作者 Tel:86-851-86690018;E-mail:gongxiaojian1@163.com

马陆的干燥全虫,体呈扁长圆柱形,栖息于山坡较潮湿处、枯枝腐叶或石块下,主要分布于贵州、云南等地区。滚山珠为药用全虫,具有清热、消肿止痛,舒筋活血等功效,主要用于治疗筋脉拘挛、跌打损伤、骨折肿痛等病状,在《中华本草-苗药卷》《贵州苗族医药研究与开发》等书籍中均有记载^[1,2]。在贵州苗族地区,用于炎症的治疗非常广泛,对肿瘤的治疗效果极其显著。但是,目前国内外关于滚山珠的相关基础研究非常薄弱,更缺乏质量控制标准体系,严重制约了滚山珠药材的合理开发和广泛利用^[3,4]。

指纹图谱是基于对物质群整体作用的认识,借助于波谱或色谱等技术获得的中药化学成分的波谱或色谱图,是实现鉴别产品真实性、评价质量一致性和产品稳定性的可靠手段^[5,6,7]。因此,本研究采用 HPLC 法建立了滚山珠指纹图谱,并进行相似度评价,通过聚类分析^[8,9] (cluster analysis, CA)、主成分分析^[10,11] (principal component analysis, PCA) 及正交偏最小二乘-判别分析^[12,13] (orthogonal partial least squares analysis, OPLS-DA) 等化学模式识别方法,筛选出引起不同批次滚山珠成分差异的主要标

志性成分,旨在为苗药滚山珠的质量控制及进一步研究提供参考^[14,15]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DIONEX Ultimate300 高相液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司);明澈 TM-D24UV 纯水/超纯水系统(法国 Millipore 公司);XS-105DU 十万分之一和 AL204 万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2 材料

酪氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140609-201513);甲醇、乙腈(购于美国 TEDIA 公司)均为色谱纯;食用酒精(购于贵州凯鑫工贸有限公司)为食品级;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。滚山珠药材自采于贵州省各地区或购于安徽、四川、广西、云南、海南等地,经贵州省生物研究所陈会明副研究员鉴定为泽马陆科动物黔锯刺马陆的全体 *Prionobelum qianensis* 的干燥全虫。具体信息见表 1。

表 1 24 批药材来源信息

Table 1 Source information of 24 batches of medicinal materials

编号 No.	产地 Origin	采集时间 Acquisition time	编号 No.	产地 Origin	采集时间 Acquisition time	编号 No.	产地 Origin	采集时间 Acquisition time
S1	广西百色	2020.10	S9	云南金沙江	2020.10	S17	贵州瓮安	2016.05
S2	贵州百花湖	2016.10	S10	贵州龙里	2016.04	S18	贵州乌当	2016.07
S3	安徽亳州	2020.10	S11	贵州龙云村	2016.05	S19	湖南湘潭	2020.10
S4	海南海口	2020.10	S12	贵州麦格乡	2016.06	S20	云南昭通	2020.10
S5	河南郑州	2020.10	S13	贵州平坝	2015.10	S21	贵州惠水	2016.06
S6	贵州赫章	2016.04	S14	贵州青岩	2015.10	S22	贵州黔西	2016.05
S7	贵州红枫湖	2016.10	S15	四川泸州	2020.10	S23	贵州桐梓	2016.05
S8	贵州花溪	2018.05	S16	云南文山	2020.10	S24	浙江嘉兴	2018.06

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取滚山珠药材粉末(过 60 目筛)1.0 g,精密称定,加 70% 食用酒精 15 mL,超声提取 30 min,过滤,滤液浓缩蒸干,用甲醇定容至 10 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜,并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏备用。

2.2 对照品溶液的制备

取酪氨酸对照品适量,精密称定,加水制成浓度为 27.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液,并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷

藏备用。

2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 \times 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1% 乙酸水(B),梯度洗脱(0 ~ 15 min,1% \rightarrow 2% A;15 ~ 25 min,2% \rightarrow 8% A;25 ~ 30 min,8% \rightarrow 14% A;30 ~ 35 min,14% \rightarrow 25% A;35 ~ 47 min,25% \rightarrow 65% A;47 ~ 70 min,65% \rightarrow 85% A);检测波长:254 nm;流速:0.8 mL/min;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;进样量:2 μL 。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验

精密吸取滚山珠供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件连续进样测定6次,以4号酪氨酸色谱峰为参照峰(S),计算得到各共有峰的相对保留时间的RSD < 0.32%,相对峰面积的RSD < 1.16%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验

取滚山珠供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件,分别在0、4、8、16、24、36 h进样测定,以4号酪氨酸色谱峰为参照峰(S),计算得到各共有峰的相对保留时间的RSD < 0.43%,相对峰面积的RSD < 1.31%,表明供试品溶液在36 h内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验

取同一批滚山珠样品6份,每份1.0 g,精密称定,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,以4号酪氨酸色谱峰为参照峰(S),计算得到各共有峰的相对保留时间的RSD < 0.52%,相对峰面积的RSD < 1.56%,表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱建立

分别取24批滚山珠各1.0 g,按“2.1”项下方法制备样品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录各色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”对数据进行分析,以S1号样品的色谱图为参照图谱,时间窗宽度为0.1 min中位数法生成对照图谱R,经多点校正后进行色谱峰匹配,建立24批样品的叠加图谱及对照图谱,标定22个共有峰,经与对照品比对,确定4号色谱峰为酪氨酸(见图1~3)。指纹图谱的共有峰保留时间及峰面积见表2。

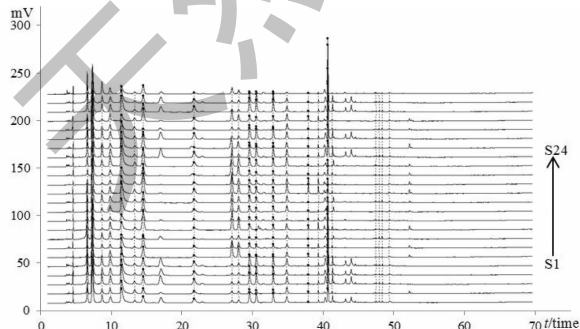


图1 24批药材的HPLC叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC superposed fingerprints of 24 batches of medicinal materials

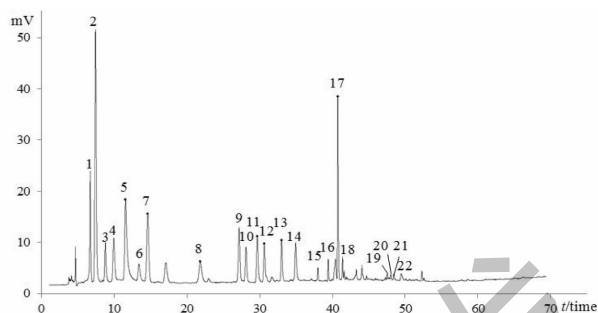


图2 药材HPLC对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC control fingerprints of medicinal materials

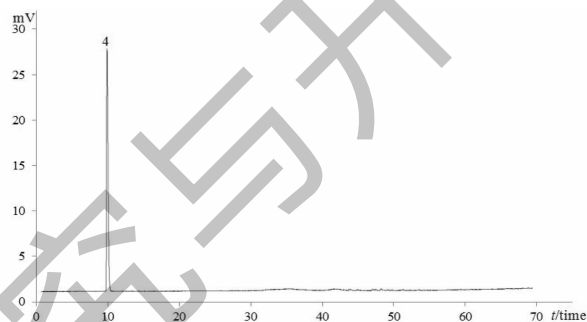


图3 酪氨酸对照品溶液的HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of tyrosine reference

2.6 相似度评价

相似度评价采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”对24批滚山珠的HPLC指纹图谱进行相似度评价,结果见表3。24批滚山珠指纹图谱的相似度除花溪S8在0.739以外,其余均在0.844~0.957之间,表明24批样品间差异较小。

2.7 聚类分析

运用SPSS.26软件,采用组间联结法,以平方欧式距离为测度对24批滚山珠样品进行聚类分析(见图4)。24批样品聚为3类:第一类是S1、S3、S4、S5、S15、S16、S19、S20,它们来自2020年于贵州省以外的各省采购的样品;第二类是S8,它是来自2018年采集于贵州省花溪区;第三类是S2、S6~S7、S9~S14、S17~S18、S21~S24,它们除S9、S24以外都是来自2015~2016年间在贵州省内各地采集的。聚类分析结果表明各批次总体差异性较小,其差异性表现出明显的地域差异性,可能与其生长环境、生长年限和气候条件等有关,但具体原因有待进一步研究。

2.8 主成分分析

以共有峰的相对峰面积为变量,利用SPSS26软件对24批样品进行主成分分析,计算相关矩阵的特

表 2 24 批药材指纹图谱共有峰的保留时间及峰面积

Table 2 Retention time and peak area of common peaks in fingerprints of 24 batches of medicinal materials

峰号 No.	保留 时间 time (min)	峰面积 Peak areas(mAU)																								保留时间 Retention time (min)	峰面积 Peak areas RSD (%)
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24		
P1	5.73	22.39	12.19	39.19	17.20	44.58	11.63	7.33	59.34	10.72	6.88	8.49	14.78	5.70	11.35	30.19	26.38	14.71	7.45	20.02	34.50	12.73	6.96	7.65	10.79	0.63	75.47
P2	6.47	41.18	44.48	63.08	47.57	59.16	29.55	21.38	45.90	25.00	29.81	46.21	58.30	29.86	44.23	60.83	54.65	45.91	44.65	44.62	42.70	33.38	29.49	30.77	29.03	0.65	28.76
P3	7.85	8.76	5.50	11.61	8.48	12.86	1.04	4.34	7.00	3.01	4.34	8.99	4.08	2.24	6.86	12.37	9.99	3.91	2.32	8.27	7.55	2.25	2.61	6.38	13.59	0.45	56.25
P4	9.04	6.46	6.14	9.72	7.82	10.71	7.07	3.97	8.15	4.35	7.08	7.10	7.69	4.75	11.74	9.07	8.12	5.88	7.72	7.80	6.44	8.73	6.11	5.42	6.83	0.44	25.76
P5	10.68	15.60	13.94	20.97	17.21	20.60	3.66	10.88	4.51	6.59	14.87	23.29	11.47	9.27	21.99	20.30	19.58	9.04	7.03	17.61	13.59	8.55	8.68	18.52	8.13	0.33	43.76
P6	12.55	1.97	4.14	3.11	2.42	3.56	2.08	1.77	2.68	1.34	2.81	3.11	5.02	3.08	4.61	3.08	2.87	3.76	3.60	2.47	1.64	3.01	1.98	2.67	2.04	0.23	32.28
P7	13.80	6.94	5.91	8.91	6.62	8.87	11.55	14.20	3.09	10.25	13.97	11.58	21.96	18.39	20.21	8.15	7.98	1.62	13.50	9.10	7.74	21.78	12.57	15.73	9.43	0.19	48.34
P8	21.13	4.26	2.72	5.95	4.08	5.36	1.96	2.58	1.52	2.01	3.04	3.73	5.04	2.55	4.61	5.87	6.65	1.92	3.30	6.23	4.12	2.53	2.23	2.57	1.23	0.00	44.82
P9	26.59	2.48	2.91	2.95	2.43	2.82	17.93	8.78	3.53	6.69	14.39	11.82	20.28	13.91	20.87	3.00	3.20	3.23	12.78	2.79	2.38	22.46	17.00	11.76	7.10	0.00	76.24
P10	27.56	2.76	2.56	3.57	2.77	3.46	12.63	6.14	3.98	4.28	6.81	6.51	10.22	6.52	10.34	3.63	3.28	2.48	6.79	2.66	2.83	12.58	10.39	7.34	4.35	0.02	56.65
P11	29.15	11.02	4.91	12.87	10.18	12.62	3.03	4.68	1.71	4.07	5.72	7.45	7.75	5.10	8.58	13.04	15.32	2.26	5.75	15.57	10.41	5.95	5.05	6.51	2.63	0.00	54.50
P12	30.14	9.80	3.59	11.63	8.94	11.75	2.71	3.80	1.93	3.78	4.51	5.76	6.71	3.94	6.92	12.23	13.76	1.57	4.48	13.34	9.54	0.02	3.66	4.61	2.50	0.00	64.33
P13	32.55	9.79	4.23	11.21	9.08	10.63	2.83	4.35	1.33	3.83	5.58	6.94	6.67	4.61	8.08	11.31	13.16	1.61	5.02	13.46	9.69	5.55	4.88	5.88	2.46	0.00	52.71
P14	34.52	6.02	6.92	7.98	5.65	8.13	5.49	4.50	4.19	2.40	6.64	6.93	10.74	6.15	9.72	8.53	7.42	6.43	7.44	6.12	4.75	6.39	4.91	6.31	1.48	0.04	32.71
P15	37.63	0.71	1.97	0.95	0.78	1.02	3.36	2.78	0.28	1.74	1.13	0.44	10.08	6.74	1.38	1.33	0.85	1.14	5.25	0.85	0.61	4.77	1.51	2.31	0.83	0.10	106.69
P16	39.08	2.70	3.34	3.62	3.29	3.25	4.39	4.87	0.44	3.39	2.00	0.85	9.02	6.77	2.49	4.28	3.36	1.63	5.07	2.94	3.05	7.95	2.96	3.63	1.86	0.07	55.61
P17	40.42	62.82	5.32	81.81	67.23	82.45	6.03	8.95	5.35	13.20	5.09	5.30	9.29	6.45	6.55	83.11	76.78	5.46	4.24	73.14	70.19	16.90	9.74	7.90	10.77	0.00	107.89
P18	41.09	6.66	2.02	9.38	7.07	8.78	1.64	2.44	0.36	0.78	0.48	0.51	2.49	2.06	0.77	8.87	8.42	1.75	1.51	7.58	6.91	3.29	3.11	2.38	0.55	0.08	85.40
P19	47.34	0.88	0.78	1.40	0.87	1.24	0.58	0.91	1.09	1.50	0.77	1.86	0.86	0.35	1.83	1.25	1.23	0.64	0.53	0.93	1.03	0.96	0.86	0.92	1.60	0.04	37.60
P20	47.86	1.07	0.65	1.46	0.92	1.14	0.50	0.65	1.81	0.68	0.43	1.28	1.51	0.57	0.84	1.31	1.14	1.18	0.57	1.16	1.00	0.58	0.59	0.65	0.62	0.04	40.26
P21	48.28	1.05	0.46	1.71	0.97	1.48	0.38	0.52	2.47	0.68	0.75	2.21	0.66	0.31	0.85	1.60	1.24	1.63	0.40	1.24	1.07	0.52	0.45	0.45	0.97	0.04	59.25
P22	49.31	1.23	1.08	1.05	1.26	1.02	1.08	1.35	1.14	1.09	1.09	1.09	1.39	1.11	1.12	1.04	1.26	1.37	1.13	1.07	1.28	1.05	1.02	1.03	1.09	0.04	10.09

表3 24批药材样品相似度评价结果

Table 3 Similarity evaluation of 24 batches of samples

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.921	S9	0.957	S17	0.855
S2	0.889	S10	0.864	S18	0.863
S3	0.938	S11	0.851	S19	0.915
S4	0.920	S12	0.881	S20	0.915
S5	0.937	S13	0.861	S21	0.875
S6	0.844	S14	0.857	S22	0.877
S7	0.887	S15	0.938	S23	0.875
S8	0.739	S16	0.936	S24	0.898

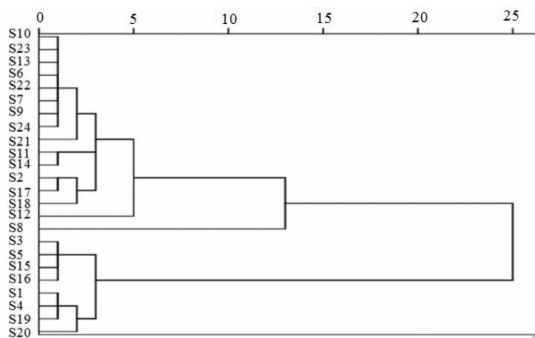


图4 24批药材样品的聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of 24 batches of medicinal materials

征值及其方差贡献率^[11]。以特征值 > 1 为提取标准,得到了前 5 个主成分的累积方差贡献率为 89.063%,能够较好的代表指纹图谱中的大部分信

息,结果见表 4。从成分载荷矩阵表可以看出,第一主成分的独立方差贡献率为 43.640%,主要反映色谱峰 1~5、8、11、12、13、17、18、20、21 的信息;第二主成分的独立方差贡献率为 20.679%,主要反映色谱峰 6、7、9、10、14~16 的信息;第三主成分的独立方差贡献率为 10.762%,主要反映色谱峰 4、6、19 的信息;第四主成分的独立方差贡献率为 9.235%,主要反映色谱峰 22 的信息;第五主成分的独立方差贡献率为 4.748%,主要反映色谱峰 1 的信息。

利用 SIMCA 14.1 软件计算主成分得分(见图 5)。结果表明 24 批药材可大致分为三类,S1、S3、S4、S5、S15、S16、S19、S20 为第一类;S8 为第二类;S2、S6、S7、S9~S14、S17、S18、S21~S24 为第三类,其结果与聚类分析结果一致。

表4 24批药材主成分特征值及方差贡献率

Table 4 Characteristic value and variance contribution rate of 24 batches of medicinal materials

成分 Component	特征值 Eigenvalue	方差贡献率 Variance contribution rate (%)	累计方差贡献率 Cumulative variance contribute rate (%)
1	9.601	43.640	43.640
2	4.549	20.679	64.318
3	2.368	10.762	75.080
4	2.032	9.235	84.315
5	1.045	4.748	89.063

2.9 正交偏最小二乘判别分析

采用 SIMCA 14.1 软件对各样品共有峰峰面积进行正交偏最小二乘判别分析,结果见图 6。不同批次样品可聚为 3 类,与聚类分析和主成分分析结果一致。提取模型中的 22 个变量的 VIP 值(见图

7),变量重要性投影值(VIP)是筛选差异性化合物的重要指标,VIP 值越高,对组间差异的影响越大^[16]。以 VIP > 1 为阈值,色谱峰从大到小分别为 17 号峰(VIP = 3.155 9)、2 号峰(VIP = 1.459 1)、1 号峰(VIP = 1.437 8)、12 号峰(VIP = 1.032 5)、11

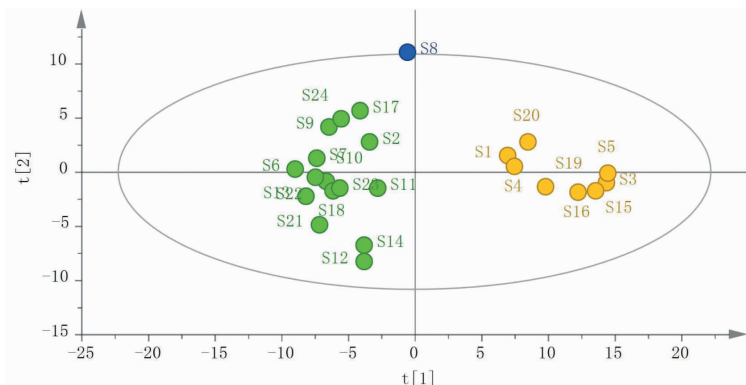


图 5 24 批药材主成分分析得分

Fig. 5 Score of principal component analysis of 24 batches of medicinal materials

号峰(VIP = 1.020 7),表明这 5 个色谱峰是影响滚山珠药材间质量差异的主要标志性成分,在之后的

研究中应多关注这几个成分。

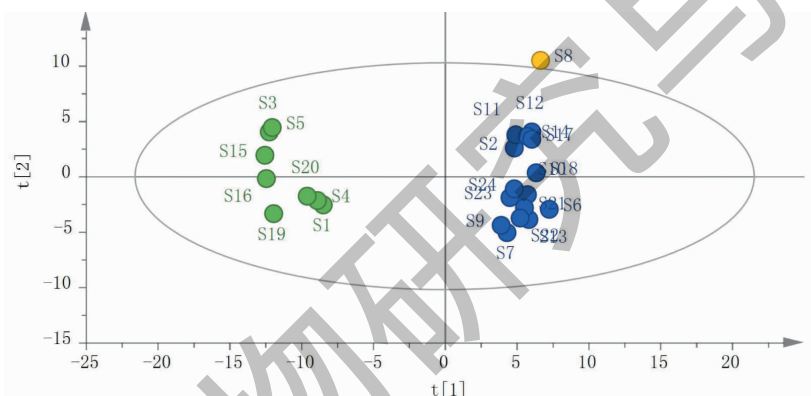


图 6 24 批药材正交偏最小二乘判别分析得分

Fig. 6 Score of orthogonal partial least squares discriminant analysis for 24 batches of medicinal materials

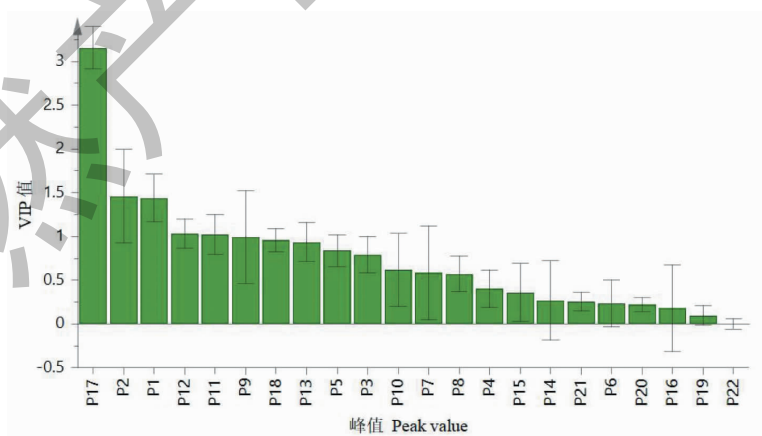


图 7 药材的正交偏最小二乘判别分析 VIP 值

Fig. 7 VIP value of orthogonal partial least squares discriminant analysis

3 讨论

3.1 色谱条件优化

试验前期考察了甲醇、乙腈洗脱系统对色谱峰

分离效果的影响,结果显示甲醇为流动相时分离效果较好,且基线平稳;考察了甲醇-0.1%甲酸水和甲醇-0.1%乙酸水的分离效果,最终选择分离效果较

好的甲醇-0.1% 乙酸水系统;分析了 210 ~ 400 nm 处全波长扫描的图谱,显示在 254 nm 下出峰数量多,基线平稳,信号响应值大;通过考察不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、柱温(25、30、35、40 °C)对色谱峰的影响,确定选择流速为 0.8 mL/min,柱温 25 °C。

3.2 供试品溶液制备方法优化

试验前期考察了超声和回流 2 种提取方式,发现其提取效率无明显差别,故选择操作较简单的超声提取;比较了水、甲醇、食用酒精作为提取溶剂,结果显示,食用酒精提取时色谱峰数目多、响应值较大。并比较不同浓度食用酒精(30%、50%、70%、90%)的提取效果,结果表明,70% 食用酒精提取时色谱峰响应值较大。综合考虑,选用 70% 食用酒精超声提取作为供试品溶液的制备方法。

3.3 小结

本研究首次建立了苗药滚山珠的指纹图谱,24 批样品指纹图谱的相似度在 0.739 ~ 0.957,指认了 1 个成分。通过化学模式识别分析,建立了滚山珠的聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分析的分类模型,明确了样品之间的归类情况。24 批样品聚为 3 类,筛选得到影响滚山珠药材间质量差异的 5 个主要标志性成分。

综上所述,本研究建立的 HPLC 指纹图谱方法稳定、可靠、重复性好,可为苗药滚山珠药材的质量控制提供参考。

参考文献

- 1 Editorial Board of Chinese Materia Medica. Chinese Materia Medica Miao Medicine Roll(中华本草苗药卷)[M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press, 2005:559-560.
- 2 Bao J. Research and Development of Miao Nationality Medicine in Guizhou(贵州苗族医药研究与开发)[M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press, 1999:103-106.
- 3 Mu DD, Gong XJ, Zhou X, et al. Determination of contents of three kinds of amino acids in *Prionobelum qianensis* Chen by the method of pre-column derivation and HPLC [J]. J Guizhou Normal Univ; Nat Sci(贵州师范大学学报:自科版), 2018, 36(3):29-35.
- 4 Su M. Study on antitumor activity and material basis of Miao medicine-*Prionobelum qianensis* Chen[D]. Guiyang: Guizhou Normal University(贵州师范大学), 2020.
- 5 Li Q, Du SM, Zhang ZL, et al. Progress in fingerprint technology on Chinese materia medica and prospect of its future development[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44: 3095-3104.
- 6 Gu RM. Theory, method and application of fingerprint equivalent coefficient [D]. Tianjin: Tianjin University(天津大学), 2008.
- 7 Li L, Li HH, Xie H, et al. Quality study of *Inulae Flos* based on HPLC and chemometrics[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52:1751-1758.
- 8 Zhong L, Liu C, He QX, et al. Fingerprint establishment, content determination and chemical pattern recognition analysis of tibetan medicine Ershiwuwei Luxue Pills[J]. China Pharm(中国药房), 2021, 32:453-459.
- 9 Li Y, Zhang Y, Zhang Z, et al. Quality evaluation of *Gastrodia elata* tubers based on HPLC fingerprint analyses and quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Molecules, 2019, 24(8):1521.
- 10 Huang WW, Wang XM, Guo YQ, et al. Study on UHPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Uncariae Ramulus Cum Uncis*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:727-733.
- 11 Yan YH, Li SP, Abdula R, et al. Establishment of HPLC fingerprint, chemistry pattern recognition analysis and content determination of aloe[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:353-361.
- 12 Liu B, Hu T, Yan W. Authentication of the bilberry extracts by an HPLC fingerprint method combining reference standard extracts[J]. Molecules, 2020, 25(11):2514.
- 13 Cui YW, He H, Zhang L, et al. Study on quality evaluation of *Dysosma versipellis* by HPLC fingerprint combined with multi-index content determination[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:2051-2060.
- 14 Zhen YQ, Feng Y, Tian W, et al. Wavelength switching of UPLC fingerprint and chemical pattern recognition of different medical parts of *Lonicera japonica*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50:4449-4454.
- 15 Wang Q, Li XQ, Hang MM, et al. Quality evaluation of *gardeniae fructus* from different areas by using chemical pattern recognition based on combination of chromatographic fingerprints and multi-component content [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50:2690-2699.
- 16 Gao S, Chen H, Zhou X. Study on the spectrum-effect relationship of the xanthine oxidase inhibitory activity of *Ligustrum lucidum*[J]. J Sep Sci, 2019, 42:3281-3292.