

落花生茎叶 HPLC 指纹图谱研究

郝子博^{1,2}, 王丽莉², 张铁军^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 中药现代研究部, 天津 300193

摘要: 目的 建立落花生茎叶 HPLC 指纹图谱并对其进行化学模式识别。方法 采用 HPLC 法, 构建不同产地 13 批落花生茎叶的指纹图谱; 采用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行化学模式识别。结果 建立了以 7 个共有峰为特征指纹信息的 HPLC 指纹图谱, 13 批样品被聚分为两大类。结论 HPLC 指纹图谱的构建为落花生茎叶内在质量的评价研究提供了参考。

关键词: 落花生茎叶; HPLC 指纹图谱; 化学模式识别; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-2050-05

HPLC fingerprint for stems and leaves of *Arachis hypogaea*

HAO Zi-bo^{1,2}, WANG Li-li², ZHANG Tie-jun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Modern Research of Traditional Chinese Medicine Department, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Key words: stems and leaves of *Arachis hypogaea* L.; HPLC fingerprint; chemical pattern recognition; cluster analysis; principal component analysis

落花生茎叶为豆科落花生属植物落花生 *Arachis hypogaea* L. 的干燥地上部分。味甘, 性平。具有散瘀消肿、解毒、止汗的功效, 用于治疗跌打损伤, 各种疮毒和盗汗等症^[1]。现代化学及药理学研究表明, 落花生茎叶中主要含有甾醇、酚酸、脂酸类等成分, 具有一定的镇静安神及降压作用, 将落花生茎叶提取物开发成的落花安神合剂更在临床上肯定了其治疗失眠的疗效^[2-8]。我国是落花生生产大国, 落花生茎叶的资源非常丰富, 但因其各地所用品种不同, 故无论是从植株形态还是化学成分上均存在一定的差异。由于落花生并不是传统中药, 所以我国对其作为药物的研究并不完善, 没有明确的质量控制规范。故本实验对落花生茎叶的 HPLC 指纹图谱进行研究, 并试图建立落花生茎叶的指纹图谱, 完善落花生茎叶的质量标准, 为其进一步开发奠定基础。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent

Technologies, 德国); AB204—N 电子分析天平 (Mettler Toledo); 超声清洗仪 (奥特宝恩斯仪器有限公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯, 乙醇、甲酸为分析纯, 均购自天津市康科德科技有限公司; 纯净水购自娃娃哈有限公司。

13 批落花生茎叶药材分别收集或采集于天津、河北、陕西、黑龙江、吉林等地 (表 1), 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为豆科落花生属植物落花生 *Arachis hypogaea* L. 的干燥地上部分。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.2%甲酸水溶液 (B), 线性梯度洗脱: 0~15 min, 15% A; 15~60 min, 5%~30% A; 60~80 min, 30%~50% A; 80~100 min, 50%~100% A; 柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 286 nm; 洗脱时间为 100 min; 进样量 10

收稿日期: 2012-04-23

作者简介: 郝子博 (1984—), 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发。Tel: 15122680549 E-mail: haozibo123@126.com

*通讯作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiezheng4@sina.com

网络出版时间: 2012-09-06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120906.1613.002.html>

表1 落花生茎叶来源

Table 1 Origins of *A. hypogaea* stems and leaves

序号	样品	产地	收集时间
S1	落花生茎叶	黑龙江大庆	2010-06
S2	落花生茎叶	吉林扶余县	2010-10
S3	落花生茎叶	天津陈咀镇	2011-10
S4	落花生茎叶	天津陈咀镇	2011-10
S5	落花生茎叶	陕西商南	2011-10
S6	落花生茎叶	天津陈咀镇	2011-11
S7	落花生茎叶	河北香河	2010-11
S8	落花生茎叶	河北香河	2011-06
S9	落花生茎叶	河北香河	2011-11
S10	落花生茎叶	河北邢台	2010-06
S11	落花生茎叶	河北邢台	2011-06
S12	落花生茎叶	河北邢台	2011-10
S13	落花生茎叶	河北武安	2011-08

μL, 柱温 30 °C。

2.2 供试品溶液的制备

将各批次样品粉碎, 过 80 目筛。取粉碎后粉末 1 g, 精密称定, 置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 100 mL, 称取质量, 超声 1 h, 放冷至室温, 用甲醇补足减少质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取原儿茶酸对照品适量, 配制成 0.1 mg/mL 的对照品溶液, 避光保存。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 S2 批次样品供试品连续进样 6 次, 测得各共有峰峰面积的 RSD 均 < 3%, 说明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 S2 批次样品 6 份, 按照“2.2”项方法制备, 供试品溶液分别测得各共有峰峰面积 RSD 均 < 3%, 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 S2 批次样品制备供试品, 分别在 0、2、6、8、12 h 进样, 测得各共有峰峰面积 RSD 均 < 3%, 说明样品在 12 h 内稳定。

3 结果

3.1 指纹图谱的测定及共有峰标记

精密吸取各供试品适量, 在“2.1”项色谱条件下进行测定。共标定 7 个特征峰 (图 1), 选取原儿茶酸作为参照峰, 保留时间与峰面积为 1, 计算其他各峰的相对保留时间与相对峰面积值, 结果见表 2 和 3。

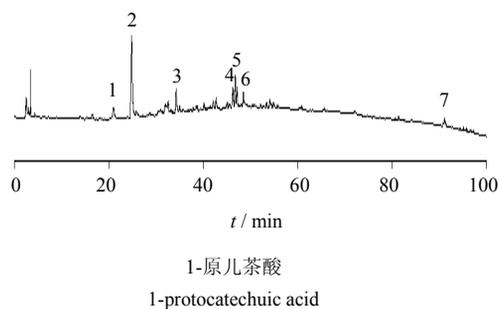


图1 落花生样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of *A. hypogaea* samples

表2 各共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks

样品	相对保留时间						
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7
S1	1	1.185 452	1.559 773	2.246 404	2.268 004	2.335 402	4.382 691
S2	1	1.182 475	1.547 330	2.221 224	2.244 188	2.306 899	4.333 333
S3	1	1.178 294	1.544 502	2.222 487	2.243 964	2.311 682	4.337 778
S4	1	1.176 315	1.508 263	2.201 199	2.219 615	2.289 829	4.301 162
S5	1	1.171 907	1.504 846	2.209 399	2.226 845	2.298 426	4.306 699
S6	1	1.132 483	1.493 645	2.129 352	2.170 658	2.182 768	4.195 524
S7	1	1.104 346	1.401 891	2.021 403	2.052 523	2.066 530	3.987 526
S8	1	1.149 425	1.468 030	2.123 482	2.152 450	2.165 101	4.175 826
S9	1	1.106 781	1.402 194	2.019 004	2.049 418	2.062 804	3.997 542
S10	1	1.110 064	1.446 123	2.048 345	2.081 049	2.093 713	4.046 967
S11	1	1.111 363	1.447 049	2.049 065	2.081 657	2.093 646	4.044 314
S12	1	1.107 524	1.430 581	2.032 372	2.063 950	2.082 253	4.015 789
S13	1	1.106 197	1.415 276	2.030 789	2.060 433	2.077 787	4.011 717
RSD / %	—	3.007 012	3.788 027	4.244 721	3.969 523	5.044 035	3.661 759

表 3 各共有峰的相对峰面积
Table 3 Relative peak areas of common peaks

样品	相对峰面积						
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7
S1	1	6.478 98	0.628 89	4.393 05	1.080 44	2.117 002	0.294 333
S2	1	7.204 13	2.594 32	1.452 20	2.025 84	1.023 256	0.421 189
S3	1	9.993 59	1.256 41	3.897 44	1.378 20	1.403 846	0.592 949
S4	1	10.855 26	0.754 39	8.855 26	1.530 70	3.030 702	0.973 684
S5	1	10.177 33	1.212 21	4.642 44	7.906 98	1.389 535	0.613 372
S6	1	14.616 82	2.000 00	3.644 86	5.065 42	5.009 346	2.794 393
S7	1	16.716 49	1.994 84	3.324 74	5.989 69	4.541 237	1.159 794
S8	1	30.948 72	4.777 78	2.136 75	10.564 10	5.803 419	1.820 513
S9	1	13.648 90	1.457 68	2.288 40	5.808 78	2.771 160	0.708 464
S10	1	18.190 00	1.405 00	3.005 00	14.180 00	4.365 000	1.190 000
S11	1	21.293 10	1.762 07	0.765 52	3.796 55	1.300 000	0.803 448
S12	1	24.876 19	4.447 62	7.342 86	15.933 33	5.542 857	2.209 524
S13	1	23.064 52	4.395 16	4.379 03	20.895 16	1.403 226	2.161 290
RSD / %	0	46.245 31	64.821 20	58.050 96	84.940 13	58.182 220	65.108 200

3.2 指纹图谱聚类分析

以 13 批不同产地的落花生茎叶为研究对象, 进行指纹图谱研究, 得到 7 个明显的共有色谱峰, 将 1 号峰设为参比峰, 将其他色谱峰相对于 1 号峰的峰面积量化, 得到原始数据矩阵, 运用 SPSS 统计分析软件对其进行系统聚类分析, 聚类分析图见图 2。从图 2 可以看出, 13 批药材可分为两类, 1、2、5 号样品为一类, 剩余 10 种样品为第二类, 不同产地落花生茎叶样品间成分差异较大。

3.3 落花生茎叶指纹图谱主成分分析 (PCA)

应用 SPSS 统计分析软件对 13 批落花生茎叶进

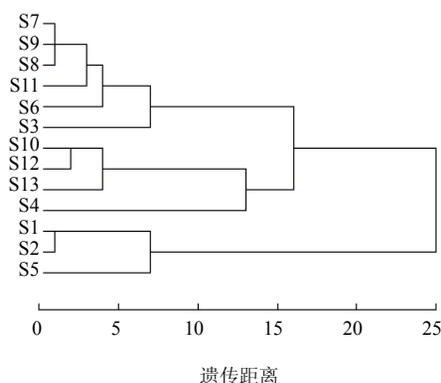


图 2 落花生茎叶聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis of *A. hypogaea* stems and leaves

行了 PCA, 即将它们投影至低维空间来看它们之间的微细差别, 先将原始数据矩阵经标准化处理, 再对其进行运算, 主成分个数提取原则为主成分对应的特征值大于 1 的前 m 个主成分, 主成分分析结果见表 4。由分析结果可知, 前 5 个成分累积贡献率可达 94.792%, 其中前 3 个成分贡献较大。将提取的 7 个成分和对应的特征值做散点图 (图 3), 观察散点图发现前 6 个成分的斜率非常陡, 而剩余的其他成分之间的斜率则非常平缓。斜率越陡贡献率越大, 斜率越平缓, 贡献率越小。

通过 SPSS 统计分析软件计算出因子负荷矩阵, 见表 5, 可以看出 1、4、6 号色谱峰在主成分 1 中有明显的正相负荷, 表明其增加, 第 1 主成分增大; 2、5 号色谱峰在第 1 主成分中有明显的逆相负荷, 表明其增加, 第 1 主成分减少。其他对第 1 主成分影响相对较小。6、7 号色谱峰有明显的正相负荷,

表 4 特征值与贡献率

Table 4 Eigenvalues and contribution rates

成分	特征值	贡献率 / %	累积贡献率 / %
1	2.709	38.694	38.694
2	1.521	21.728	60.422
3	1.107	15.819	76.241
4	0.776	11.079	87.320
5	0.523	7.472	94.792
6	0.229	3.266	98.059
7	0.136	1.941	100.000

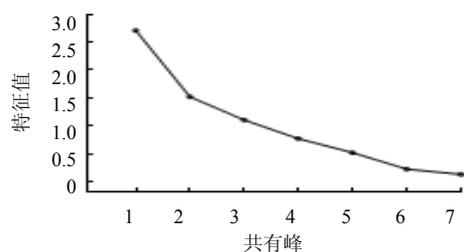


图 3 落花生茎叶特征值散点图

Fig. 3 Scatter plot of eigenvalues for *A. hypogaea* stems and leaves

表 5 因子负荷矩阵

Table 5 Matrix of factor loadings

色谱峰	1	2	3
1	0.289	-0.285	0.297
2	-0.294	0.112	0.107
3	-0.089	-0.309	0.746
4	0.300	0.076	-0.014
5	-0.214	0.103	0.006
6	0.235	0.419	0.122
7	-0.022	0.526	0.481

表明其增加, 第 2 主成分增大; 1 色谱峰、3 色谱峰在主成分 2 中有明显的逆相负荷, 表明其增加, 第 2 主成分减少; 其他对第 2 主成分影响相对较小。3、7 号色谱峰在主成分 3 中有明显的正相负荷, 表明其增加, 第 3 主成分增大, 其他对第 3 主成分影响相对较小。

对数据矩阵进行 PCA 后, 分别以其第 1、2、3 主成分建立坐标系, 进行投影即可得到所有样本的 PCA 平面和 3D 投影图 (图 4、5)。样本间内在的相互关系即可较好地表现出来进而实现样本之间的分类。从图中可以看出将落花生茎叶分为两类, 其结果与聚类分析结果一致。

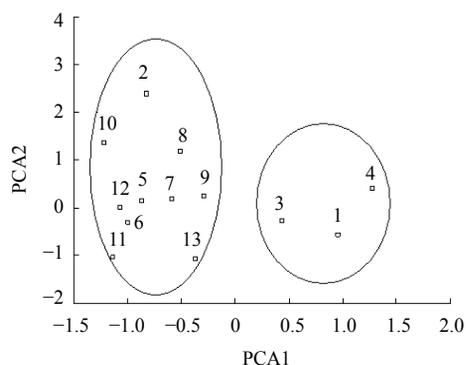


图 4 主成分平面得分图

Fig. 4 Score graph of principal components

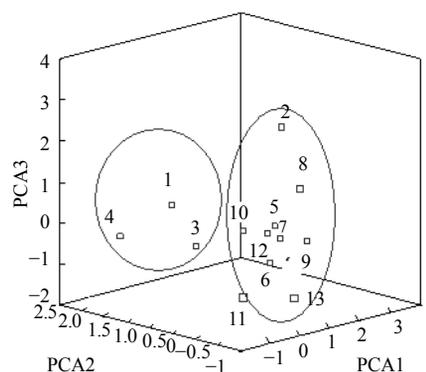


图 5 主成分 3D 得分图

Fig. 5 3D score graph of principal component

3.4 指纹图谱相似度分析

将在聚类分析中分为一类的 10 批药材数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件 (2004A) 进行色谱峰的匹配, 10 批样品的 HPLC 指纹图谱纵向叠加图见图 6, 参照文献方法^[9]测得各药材相似度。S2、S5、S6、S7、S8、S9、S10、S11、S12、S13 的相似度分别为 0.923、0.957、0.978、0.931、0.882、0.915、0.933、0.964、0.943、0.948。从分析结果可以看出, 不同产地不同采收时间的落花生茎叶, 在其成分的比例上有一定差异。

4 讨论

4.1 检测波长的选择

分别对 220、254、286、320 nm 波长下进行 HPLC 检测波长的考察, 发现在 286 nm 下分离度最佳,

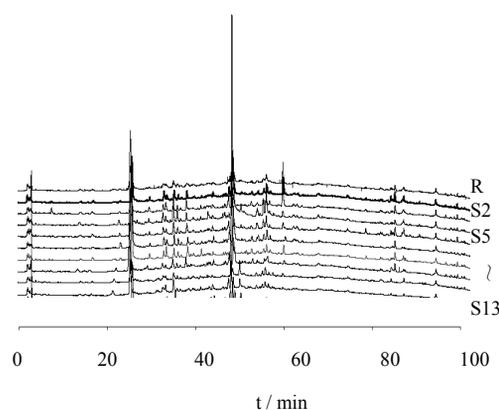


图 6 10 批落花生茎叶的 HPLC 指纹图谱纵向叠加图

Fig. 6 Vertical overlap of HPLC fingerprint for ten batches of *A. hypogaea* stems and leaves

且各色谱峰均能完好地体现在色谱图上, 故该指纹图谱选用 286 nm 作为液相条件。

4.2 色谱条件方法学考察

色谱条件方法学考察的统计学计算, 目前国内学者常用统计学计算方法: ①以共有峰的相对保留时间、相对峰面积计算各指纹图谱的 RSD 考察精密度、稳定性、重复性, 要求 RSD 均 $<5\%$ ^[10]; ②以峰面积百分数 $>5\%$ 的全部色谱峰的相对保留时间、相对峰面积计算各指纹图谱的 RSD 考察精密度、稳定性、重复性, 要求 RSD 均 $<5\%$ ^[11]。

4.3 不同产地落花生茎叶的差异性

通过各种指纹图谱考察方法可以发现, 天津与河北所产落花生茎叶较为相近, 与黑龙江、吉林等产地的落花生茎叶有很大差异, 除自然环境的差异外, 种植品种也有较大差异, 如来自于黑龙江的落花生样品为“小白沙”; 吉林的样品则为吉林省的特色品种“四粒红”; 而天津与河北的落花生则大多数为“中花”与“农花”; 所以不同种植品种的落花生茎叶有较大的成分差异。

4.4 指纹图谱相似度评价

通过对 10 批样品的指纹图谱分析表明, 产地不同的落花生茎叶 HPLC 指纹图谱有很大的差异, 但均具有相同的色谱峰。经相似度计算, 发现其相似度除 S8 外均在 0.9~1.0, 也说明不同产地, 不同采收时间的落花生茎叶有一定的差异。

4.5 建立指纹图谱的意义

本实验建立的 HPLC 指纹图谱分析方法, 能够使

落花生茎叶的共有成分在色谱图中体现, 所建立的指纹图谱具有较好的稳定性与可控性, 可用于落花生茎叶的质量控制, 为其进一步作为新药开发奠定基础。

参考文献

- [1] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2009.
- [2] 韦国锋, 覃特营, 何有成. 花生茎叶降压作用有效成分的初步研究 [J]. 右江民族医学院学报, 1991, 13(2): 11-13.
- [3] 何晶晶, 解静, 王国华, 等. 落花生茎叶挥发性成分 GC-MS 分析 [J]. 中成药, 2007, 29(9): 1371-1373.
- [4] 何晶晶, 解静, 韩竹箴, 等. 落花生枝叶正丁醇部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 681-683.
- [5] 刘劲松, 王刚, 董超, 等. 花生茎叶化学成分研究 [J]. 中成药, 2008, 30(3): 419-421.
- [6] 刘劲松, 王刚, 金家宏, 等. 花生茎叶化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2008, 39(5): 666-668.
- [7] 刘劲松, 王刚, 王国凯. 花生茎叶化学成分研究 (III) [J]. 中成药, 2009, 31(12): 1902-1903.
- [8] 王翹楚, 徐建, 施明, 等. 落花生枝叶制剂治疗失眠症临床疗效观察 [J]. 上海中医药杂志, 2001, 35(5): 8-10.
- [9] 覃洁萍, 冯旭, 邓家刚, 等. 杠果叶 HPLC 指纹图谱共有模式的建立及在近缘品种扁桃叶鉴别中的应用 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1543-1546.
- [10] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 818-820.
- [11] 王花红, 郭五保, 顾莹, 等. 山茱萸药材指纹图谱的研究 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1922-1928.