

基于 RP-HPLC-DAD 指纹图谱结合化学计量学评价不同品种木豆叶质量及主要成分含量测定

符丽娜, 王立涛, 王建栋, 王燕秋, 蔡子辉, 闫鑫宇, 赵棚权, 张 谡, 付玉杰*

北京林业大学林学院, 北京 100083

摘要: 目的 基于 RP-HPLC-DAD 指纹图谱结合化学计量学方法, 评价不同品种木豆 *Cajanus cajan* 叶质量特征的共有性和差异性, 为木豆叶的质量评价提供科学依据。方法 通过 RP-HPLC-DAD 建立 13 个不同品种木豆叶的 RP-HPLC-DAD 指纹图谱, 进行相似度分析 (similarity analysis, SA), 结合聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 对木豆叶质量进行综合评价, 并对样品中 6 种主要成分进行含量测定。结果 木豆叶 RP-HPLC-DAD 指纹图谱共标定 13 个共有峰, 13 个品种木豆叶的相似度均在 0.90 以上, 通过 HCA 可将这 13 个品种的木豆叶分为 5 类。PCA 与 HCA 结果基本一致, 经过 PCA 分析发现 S8 的综合得分最高, 质量最好, 其次是 S9 和 S12。PLS-DA 与 PCA 结果基本一致, 不同品种木豆叶的化学成分差异主要由 7、10、6、9、11 号 5 个色谱峰引起的。S8、S9 和 S12 的含量处于前 3, 与 PCA 分析的综合得分一致。结论 指纹图谱结合 HCA、PCA 和 PLS-DA 可以全面的评价木豆叶质量, 为木豆叶的质量控制提供全面的参考。

关键词: 木豆叶; 指纹图谱; 化学计量学; 聚类分析; 主成分分析; 最小二乘判别分析; 荭草苷; 异牡荆苷; 牡荆苷; 木犀草苷; 质量评价

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)24-7880-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.025

Quality evaluation of different *Cajanus cajan* leaves based on RP-HPLC-DAD fingerprint combined with chemometrics and determination of main components

FU Li-na, WANG Li-tao, WANG Jian-dong, WANG Yan-qiu, CAI Zi-hui, YAN Xin-yu, ZHAO Peng-quan, ZHANG Su, FU Yu-jie

College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Objective To evaluate the commonality and difference of *Cajanus cajan* leaves based on RP-HPLC-DAD fingerprints combined with chemometric methods, providing a scientific basis for the quality evaluation of *C. cajan* leaves. **Methods** The RP-HPLC-DAD fingerprints of 13 different species of *C. cajan* leaves were established by RP-HPLC-DAD. The quality of *C. cajan* leaves was evaluated by similarity analysis (SA), hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and partial least square discriminant analysis (PLS-DA) and six main components in the sample were determined by RP-HPLC-DAD. **Results** The HPLC fingerprint of *C. cajan* leaves was calibrated with 13 common peaks, and the similarity of them were all above 0.90. These 13 species of *C. cajan* leaves were divided into five categories by HCA. The results of PCA and HCA were basically consistent. According to PCA, S8 had the highest comprehensive score and the best quality, followed by S9 and S12. The results of PLS-DA and PCA were basically consistent. The differences in composition of *C. cajan* leaves were mainly caused by chromatographic peaks 7, 10, 6, 9, and 11. The content of S8, S9 and S12 were among the top 3, which was consistent with the comprehensive score of PCA. **Conclusion** Fingerprint combined with HCA, PCA and PLS-DA can comprehensively evaluate the quality of *C. cajan* leaves and provide a comprehensive reference for quality control of *C. cajan* leaves.

Key words: leaves of *Cajanus cajan* (L.) Millsp; fingerprint; chemometrics; cluster analysis; principal component analysis; partial least square discriminant analysis; orientin; isovitexin; vitexin; luteoloside; quality evaluation

收稿日期: 2022-03-30

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31930076); 通络生骨胶囊品质提升研究 (2020HXFWLXY001)

作者简介: 符丽娜 (1997—), 女, 硕士, 研究方向为森林植物资源开发与利用。Tel: 13121888511 E-mail: 1315136640@qq.com

*通信作者: 付玉杰, 博士生导师, 教授, 从事森林资源活性成分提取分离与产业化开发。Tel: (010)62926233 E-mail: yujie_fu@163.com

木豆 *Cajanus cajan* (L.) Millsp. 为豆科木豆属植物, 又称为扭豆、柳豆、花豆、树豆, 主要分布于我国云南、海南、广东、广西、四川等地^[1-2]。木豆叶具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗癌、镇痛的作用^[3-5], 民间将其用于治疗褥疮、水痘、股骨头坏死、结石、黄疸和糖尿病等疾病^[6-7]。浙江海正药业通络生骨胶囊以木豆叶为唯一原料, 是我国治疗股骨头坏死的特效药。研究表明, 木豆叶中含有多种黄酮类(荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、木犀草苷、球松素)和芪类化合物(木豆芪酸), 具有抗高脂血症、抗脑缺血缺氧损伤、抗骨质疏松等作用^[8-10]。

目前, 木豆叶的质量控制指标只有异牡荆苷、牡荆苷^[11-12], 仅依靠单一或几个化学成分无法准确的反映药材的整体质量。对于木豆叶指纹图谱研究较少有报道^[13-15], 且缺少同时测定荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、木犀草苷、球松素和木豆芪酸含量的简单高效分析方法。本实验采用 RP-HPLC-DAD 法, 建立了木豆叶的指纹图谱, 结合化学计量学对不同品种木豆叶的质量进行评价, 并对其中的 6 种主要化学成分进行了含量测定, 以期为该药材的质量控制提供参考依据, 为木豆叶资源高值化开发利用提供科技支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 搭配二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); 匀质机(广州艾卡仪器设备有限公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司); BSA224S-CW 型万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); Multifuge×1R 高效速冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司); Cascada III.I5 型超纯水系统(北京颇尔过滤器有限公司)。

1.2 材料

对照品荭草苷(批号 wkq19031201)、异牡荆苷(批号 wkq16082004)、牡荆苷(批号 wkq16031003)、木犀草苷(批号 wkq16052202)(质量分数>98%)均购自四川省维克奇生物科技有限公司; 对照品球松素、木豆芪酸(质量分数>98%)由实验室分离而得; 乙腈(色谱纯)、甲酸(色谱纯)购自北京百灵威科技有限公司; 无水乙醇(分析纯)购自北京化工厂; 13 批品种木豆叶(表 1)来源于云南红河, 由中国林业科学研究院昆明昆虫资源研究所马宏教授提供, 采集日期为 2020 年 9 月 16 日, 由北京林

表 1 木豆叶品种信息

Table 1 *C. cajan* leaves variety information

编号	品种名称	编号	品种名称
S1	2671	S8	LP-1
S2	2740	S9	R7
S3	3359	S10	R10
S4	7035	S11	R11
S5	A5	S12	R12
S6	A8	S13	R13
S7	C5		

业大学林学院付玉杰教授鉴定为豆科植物木豆 *C. cajan* (L.) Millsp. 的干燥叶。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

精确称取 1 g 木豆叶样品, 置于锥形瓶中, 加 50 mL 70%乙醇, 高速匀质 1 min, 超声 30 min 提取 1 次, 超滤或离心后用 70%乙醇定容至 50 mL, 取上清液用 0.22 μm 的滤膜滤过备用。

2.2 对照品溶液的制备

分别取荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、木犀草苷、球松素、木豆芪酸对照品适量, 精密称定, 分别用 100%甲醇溶解并定容, 得到质量浓度为 200、100、50、125、130、150 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~10 min, 20% B; 10~20 min, 20%~65% B; 20~40 min, 65%~80% B; 40~45 min, 80%~20% B; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 ℃; 进样量为 20 μL; 检测波长为 286 nm, 色谱图见图 1。

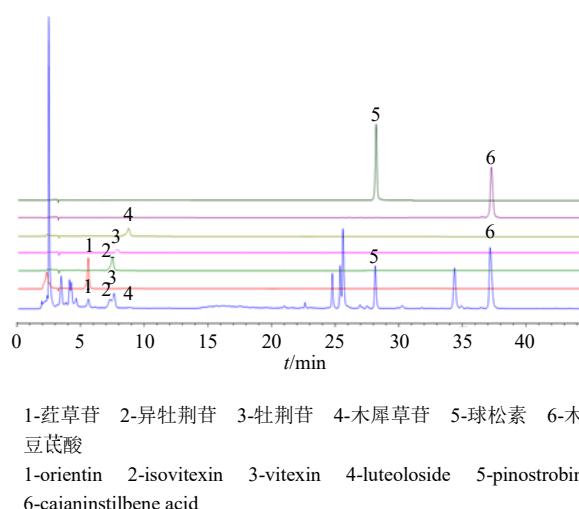


图 1 供试品和对照品的 RP-HPLC-DAD 色谱图

Fig. 1 RP-HPLC-DAD chromatogram of test substance and reference substance

2.4 方法学考察

2.4.1 精密性试验 取同一批木豆样品 S8 (LP-1) 1 g, 精密称定, 按“2.1”项下制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件连续测定 6 次, 记录峰面积值, 均以球松素为参比峰, 测得 S8 样品 13 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.0%, 相对峰面积 RSD 均小于 5.0%。

2.4.2 稳定性试验 取同一批木豆样品 S8 (LP-1) 1 g, 精密称定, 按“2.1”项下制备供试品溶液, 在室温放置 0、2、4、8、12、24 h 后按“2.3”项下色谱条件分别测定, 记录峰面积值, 以球松素为参比峰, 测得 S8 样品 13 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 4.0%, 相对峰面积 RSD 均小于 10.0%。

2.4.3 重复性试验 取同一批木豆样品 S8 (LP-1) 1 g, 精密称定, 按“2.1”项下的方法分别制备 6 份平行供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进行测定,

记录峰面积值, 以球松素为参比峰, 测得 S8 样品 13 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.0%, 相对峰面积 RSD 均小于 5.0%。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱的生成及共有峰的确定

取 13 个不同品种的木豆叶, 分别按“2.1”项下的方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 得到 13 个品种木豆叶的色谱图。将这 13 个不同品种木豆叶的色谱图以 AIA 格式导入由国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版), 以 S9 号样品的指纹图谱作为参照图谱, 以平均数法生成对照图谱, 时间窗宽度为 0.9 s, 经多点校正、自动匹配后生成木豆叶指纹图谱的共有模式, 13 个品种木豆指纹图谱叠加图共标定共有峰 13 个(图 2)。

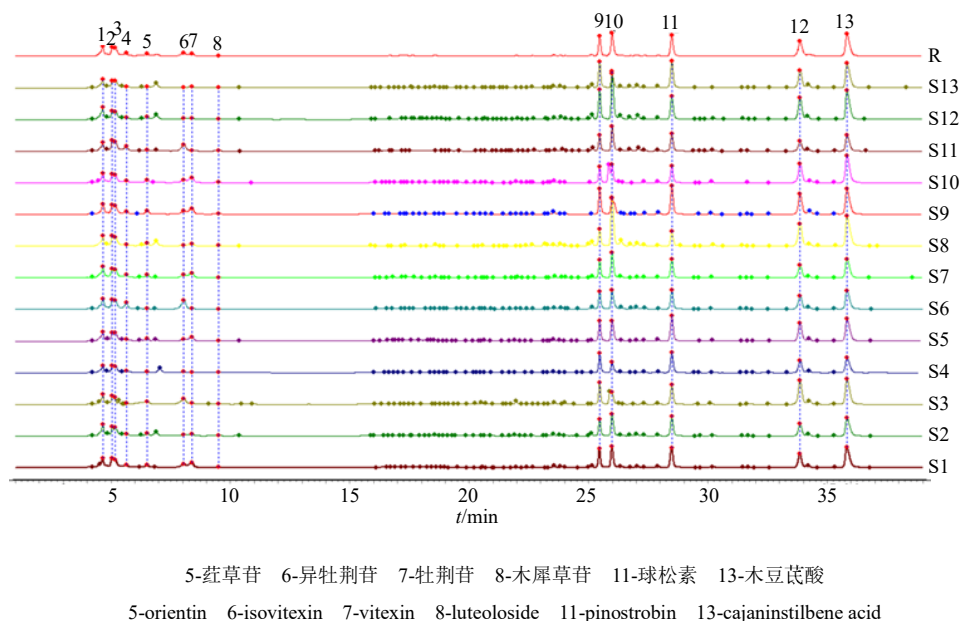


图 2 13 个木豆品种 RP-HPLC-DAD 指纹图谱叠加图

Fig. 2 RP-HPLC-DAD fingerprint overlay of 13 *C. cajan* leaves varieties

通过 RP-HPLC-DAD 将各对照品的保留时间与各木豆叶的对照指纹图谱 (S9) 进行比较, 共指认了其中的 6 个共有峰, 分别为荳蔻草 (5 号峰)、异牡荆苷 (6 号峰)、牡荆苷 (7 号峰)、木犀草苷 (8 号峰)、球松素 (11 号峰)、木豆芪酸 (13 号峰)。选择出峰时间适中、峰面积较大、对称性较好的球松素 (11 号峰) 作为参照峰。

3.2 相似度 (similarity analysis, SA) 评价

如表 2 所示, 13 个品种木豆与对照指纹图谱的相似度见表 2, 均在 0.90 以上, 说明各品种木豆间

相似度良好。

3.3 聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)

以木豆样品中 13 个共有峰的峰面积为变量, 得到 13×13 阶原始数据矩阵, 运用 SPSS 19.0 软件, 采用组间连接法, 以欧式平方距离为度量标准, 对 13 个品种木豆样品进行 HCA 分析。当分类距离为 15 时, 13 个品种木豆样品可聚为 5 类, S4、S8、S12 分别单独聚为 1 类, S3、S6、S11 聚为 1 类, 剩余品种聚为 1 类 (图 3)。

表 2 13 个木豆品种 HPLC 指纹图谱相似度评价

Table 2 Evaluation of HPLC fingerprint similarity of 13 *C. cajan* leaves varieties

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.994	S8	0.947
S2	0.990	S9	0.992
S3	0.959	S10	0.976
S4	0.972	S11	0.968
S5	0.994	S12	0.978
S6	0.970	S13	0.973
S7	0.990		

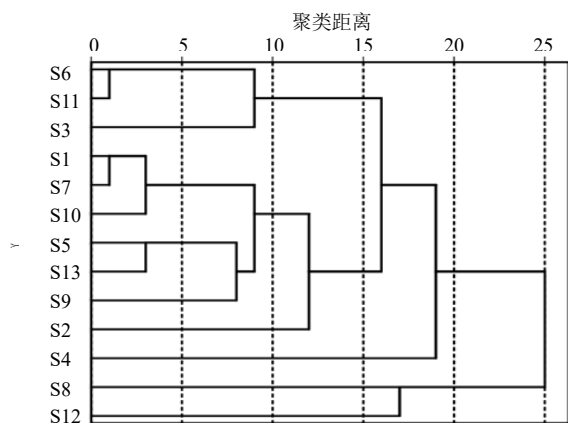


图 3 13 个品种木豆指纹图谱 HCA 分析的树状图

Fig. 3 HCA dendrogram of fingerprints of 13 *C. cajan* leaves varieties

3.4 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

以木豆样品中 13 个共有峰的峰面积为变量, 运用 SPSS 19.0 分析软件进行 PCA 分析, 提取得到 5 个主成分, 其特征值 λ 均 >1 , 累计方差贡献率为 $88.614\% > 85\%$, 可以代表样品 88.614% 的信息 (表 3), 因子载荷矩阵见表 4。第 1 主成分的信息主要来自于 8、10、12 和 13 号色谱峰; 第 2 主成分信息主要来自 3 和 10 号色谱峰; 第 3 主成分信息主要来自 2 和 9 号色谱峰; 第 4 主成分信息主要来自 7 号色谱峰; 第 5 主成分信息主要来自 1 号峰。用 SPSS 19.0 进行因子分析时, 得到的是因子载荷矩阵, 未经过旋转, 计算主成分得分时, 需要用未旋

表 3 木豆叶主成分分析特征值和方差贡献率

Table 3 PCA of *C. cajan* leaves eigenvalues and variance contribution rate

成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.463	34.327	34.327
2	2.384	18.335	52.663
3	1.983	15.253	67.916
4	1.306	10.049	77.965
5	1.124	8.649	86.614

表 4 因子载荷矩阵

Table 4 Component matrix

峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
1	0.442	0.307	0.207	0.124	0.712
2	-0.562	-0.396	0.570	0.252	-0.036
3	0.254	0.529	0.205	0.155	0.259
4	-0.786	0.445	0.265	-0.130	0.132
5	0.420	-0.522	-0.570	0.273	0.029
6	-0.769	0.402	0.374	0.120	0.035
7	0.294	-0.231	0.202	0.880	0.089
8	0.770	0.218	-0.249	-0.251	0.273
9	0.456	-0.475	0.523	-0.478	0.144
10	0.708	0.555	0.050	0.117	-0.076
11	0.210	-0.723	0.489	-0.128	0.292
12	0.678	0.167	0.469	-0.002	-0.442
13	0.780	0.189	0.448	0.027	-0.375

转的因子载荷矩阵的系数除以对应成份特征根的平方根作为指标的系数权重, 即特征向量。特征向量 U 由因子载荷矩阵 A 以及特征值 λ 计算而来, 即 $U_i = A_i / \lambda_i^{1/2}$, 求得特征向量 (表 5)。

以 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 代表 5 个主成分作为 13 个品种木豆样品成分所表达的信息, 以标准化的共有峰峰面积 ($A_1 \sim A_{13}$) 为变量, 建立起品质评价模型, 计算其综合得分。 $X_1 = 0.209 A_1 - 0.266 A_2 + 0.120 A_3 - 0.372 A_4 + 0.199 A_5 - 0.364 A_6 + 0.139 A_7 + 0.364 A_8 + 0.216 A_9 + 0.335 A_{10} + 0.099 A_{11} + 0.321 A_{12} + 0.369 A_{13}$; $X_2 = 0.199 A_1 - 0.257 A_2 + 0.342 A_3 + 0.288 A_4 - 0.388 A_5 + 0.261 A_6 - 0.149 A_7 + 0.141 A_8 - 0.307 A_9 + 0.359 A_{10} - 0.468 A_{11} + 0.108 A_{12} + 0.122 A_{13}$; $X_3 = 0.147 A_1 + 0.405 A_2 + 0.145 A_3 + 0.188 A_4 - 0.405 A_5 + 0.265 A_6 + 0.143 A_7 - 0.176 A_8 + 0.371 A_9 - 0.035 A_{10} + 0.347 A_{11} + 0.333 A_{12} + 0.318 A_{13}$; $X_4 = 0.108 A_1 + 0.220 A_2 + 0.136 A_3 - 0.113 A_4 + 0.239 A_5 + 0.105 A_6 + 0.770 A_7 - 0.220 A_8 - 0.419 A_9 + 0.102 A_{10} - 0.112 A_{11} - 0.002 A_{12} + 0.024 A_{13}$; $X_5 = 0.672 A_1 - 0.034 A_2 + 0.244 A_3 + 0.124 A_4 + 0.028 A_5 + 0.033 A_6 + 0.084 A_7 + 0.257 A_8 - 0.136 A_9 - 0.072 A_{10} + 0.275 A_{11} - 0.417 A_{12} - 0.354 A_{13}$; 综合得分 $X = (34.327\% X_1 + 18.335\% X_2 + 15.253\% X_3 + 10.049\% X_4 + 8.649\% X_5) / 86.614\%$, 结果见表 6。S8、S12 和 S9 得分最高。为进一步分析 13 个品种木豆样品间的组间差距, 将木豆样品中 11 个共有峰的峰面积导入 SIMCA 13.0 软件绘制 PCA 得分图, 见图 4。13 个品种木豆被分为 5 类, 与 HCA 结果基本一致, 样品之间的离散程度较大, 表明样

表 5 成分的特征向量

Table 5 Principal component loading matrix

峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
1	0.209	0.199	0.147	0.108	0.672
2	-0.266	-0.257	0.405	0.220	-0.034
3	0.120	0.342	0.145	0.136	0.244
4	-0.372	0.288	0.188	-0.113	0.124
5	0.199	-0.338	-0.405	0.239	0.028
6	-0.364	0.261	0.265	0.105	0.033
7	0.139	-0.149	0.143	0.770	0.084
8	0.364	0.141	-0.176	-0.220	0.257
9	0.216	-0.307	0.371	-0.419	0.136
10	0.335	0.359	0.035	0.102	-0.072
11	0.099	-0.468	0.347	-0.112	0.275
12	0.321	0.108	0.333	-0.002	-0.417
13	0.369	0.122	0.318	0.024	-0.354

表 6 木豆叶主成分得分及排名

Table 6 Principal component scores and rankings of 13 *C. cajan* leaves varieties

品种	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X	排名
S1	-1.096	-0.969	-0.272	1.024	-0.590	-0.628	10
S2	0.684	0.827	-2.085	-0.444	1.725	0.200	4
S3	-0.798	0.858	1.451	-1.044	-1.539	-0.154	8
S4	-1.077	-2.566	-2.809	-1.027	-0.635	-1.647	13
S5	0.083	-0.646	0.892	0.779	0.176	0.161	5
S6	-3.254	1.764	1.087	-0.558	0.823	-0.708	11
S7	-0.064	0.036	-0.712	1.271	1.155	0.120	6
S8	3.759	2.916	-1.199	0.075	-0.903	1.814	1
S9	1.597	-1.672	1.857	1.084	1.205	0.852	3
S10	0.078	-0.020	-0.112	2.017	-1.627	0.079	7
S11	-3.518	1.378	-0.062	-0.193	0.196	-1.117	12
S12	3.202	-0.209	1.150	-1.414	0.458	1.309	2
S13	0.405	-1.698	0.816	-1.571	-0.443	-0.282	9

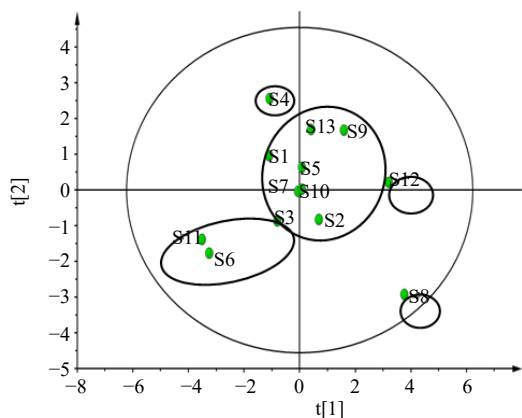


图 4 13 个木豆叶品种的 PCA 得分图

Fig. 4 PCA scores of 13 *C. cajan* leaves varieties

品差异性较大。

3.5 最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)

在 PCA 分析提取得到 5 个主成分的基础上, 建立有监督模式 PLS-DA 模型。PLS-DA 得分图如图 5 所示, 13 个木豆品种分成 5 组, 该结果与 PCA 结果一致, 说明不同品种的木豆化学成分均存在差异。根据变量重要性投影值 (variable importance in the projection, VIP) 图 (图 6) 可知, $VIP > 1$ 的色谱峰有 7、10、6、9、11 号峰, 说明不同品种木豆叶的化学成分主要是由上述成分引起的。

3.6 不同品种木豆叶中主成分含量比较

分别精密称取不同品种的木豆样品 1.0 g, 每个样品平行 3 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下的色谱条件进行测定, 计算各样品中

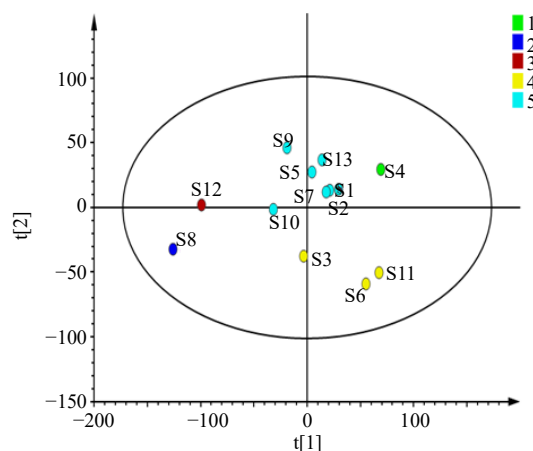


图 5 13 个木豆叶样品 PLS-DA 得分图

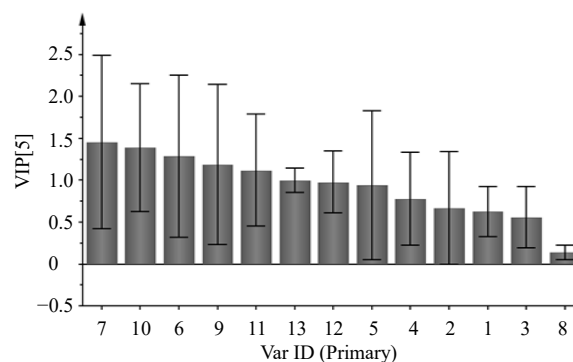
Fig. 5 PLS-DA scores of 13 *C. cajan* leaves varieties

图 6 13 个木豆叶样品 VIP 值图

Fig. 6 VIP value diagram of 13 *C. cajan* leaves varieties

荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、木犀草苷、球松素和木豆芪酸的含量,结果见表 7。结果表明,不同木豆品种间化学成分的含量差异较大,在 13 个品种の木豆材料中球松素和木豆芪酸的含量都比较高,最高分别可达 3.5、8.5 mg/g,牡荆苷和木犀草苷的含量都比较低,大多数品种都没有超过 0.5 mg/g。木豆芪酸含量最高的品种是 S8,其次是 S12,球松素含量最高的品种是 S9,其次是 S5,球松素和木豆芪酸总含量最高的 3 个品种是 S9、S8 和 S12。荭草苷

含量最高的品种是 S4,其次是 S9,异牡荆苷含量最高的品种是 S6,其次是 S11。以木豆叶入药时可以根据木豆品种各个化学成分的含量以及生物活性来进行适当选择。荭草苷在临床上主治冠心病、心绞痛、心血瘀阻证等心血管疾病^[16],异牡荆苷主要用于抑菌、抗感染、抗炎等方面的治疗^[17],球松素和木豆芪酸具有治疗股骨头坏死和骨质疏松的作用^[18]。因此,可以根据治疗目标不同选择合适的木豆叶作为药材。

表 7 样品含量测定结果 ($n = 3$)

Table 7 Determination results of sample content ($n = 3$)

品种	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	荭草苷	异牡荆苷	牡荆苷	木犀草苷	球松素	木豆芪酸
S1	1.522±0.004	2.591±0.057	0.986±0.004	0.294±0.009	2.846±0.039	5.748±0.065
S2	1.515±0.023	0.682±0.029	0.378±0.002	0.496±0.070	2.689±0.070	4.960±0.179
S3	1.943±0.313	3.815±0.065	0.204±0.011	0.336±0.013	2.785±0.040	7.296±0.054
S4	3.388±0.097	0.482±0.007	0.004±0.007	0.360±0.002	2.896±0.083	4.398±0.078
S5	1.265±0.007	1.107±0.045	0.780±0.004	0.256±0.003	3.487±0.036	6.265±0.098
S6	0.178±0.005	5.950±0.080	0.084±0.011	0.273±0.008	2.548±0.023	5.292±0.075
S7	1.812±0.016	2.062±0.021	0.993±0.009	0.408±0.010	2.576±0.037	5.374±0.036
S8	1.823±0.015	0.418±0.028	0.460±0.003	0.506±0.018	2.027±0.030	8.466±0.076
S9	2.240±0.093	2.203±0.065	1.254±0.016	0.416±0.010	3.835±0.287	7.195±0.071
S10	1.580±0.154	2.170±0.186	1.092±0.007	0.299±0.069	2.411±0.060	7.566±0.261
S11	0.413±0.009	4.872±0.036	0.077±0.008	0.267±0.005	2.372±0.031	4.500±0.040
S12	1.305±0.180	0.320±0.010	0.270±0.008	0.483±0.013	3.020±0.105	7.915±0.228
S13	0.763±0.018	0.119±0.004	0.208±0.007	0.312±0.007	3.457±0.171	6.490±0.305

4 讨论

不同品种の木豆叶所具有的化学成分各有差异,进而影响其药效,因此有必要建立一种可靠的木豆叶质量控制方法。本实验采用二极管阵列检测器检测,以峰数和分离度为指标,将样品在 286~335 nm 波长下进行扫描,分别考察了 254、286、335 nm 波长下的色谱峰,结果 286 nm 下的色谱峰分离效果最好,因此确定 286 nm 作为检测波长。依据此色谱方法建立起木豆叶的指纹图谱,发现 13 个品种木豆叶的相似度均在 0.9 以上,说明这些木豆叶中化学成分的种类相差不大,但在含量上存在一定差异。

由 HCA 结果可知,这 13 个云南红河地区的木豆样品进而分为 5 类,13 个品种木豆样品可聚为 5 类,S4、S8、S12 分别单独聚为 1 类,S3、S6、S11 聚为 1 类,剩余品种聚为 1 类。PCA 结果显示,S8 样品的综合得分最高,该样品中木豆芪酸的含量是所有样品中最高的,其次是 S12 样品。Xu 等^[19]研

究表明木豆芪酸具有广泛的生物活性,包括抗病毒、抗炎、抗氧化、抗菌作用,还可以用于股骨头坏死和骨质疏松的治疗。因此,S8 和 S12 可以作为专门提供木豆芪酸的药材。S9 的综合得分排在第 3,该样品中各个化学成分的含量都偏高。结合主成分综合得分和成分含量测定结果可知,综合得分排名前 3 的 S8、S9、S12 其成分含量也排在前面,主成分综合得分排名为倒数的 S4、S11、S6,它们的含量也都最低。因此,13 个样品主成分综合得分与样品成分含量具有极大的相关性,荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、木犀草苷、球松素和木豆芪酸可作为木豆叶质量控制的指标成分。PLS-DA 分析结果表明,不同品种木豆叶的化学成分主要是由 7 (牡荆苷)、10、6 (异牡荆苷)、9、11 (球松素) 号峰引起的,13 号峰 (木豆芪酸) 的 VIP 值接近 1,也是引起不同品种木豆叶化学成分的差异。

随着人们对中药需求量的增大以及用药安全意识的加强,中药质量控制越显重要。指纹图谱作为

中药质量评价的模式, 可用于评价药材的一致性和稳定性, 以其科学的理论依据获得了国际上的一致认可^[20]。指纹图谱在色谱峰未明确为何种成分的情况下, 仍能给出充分、可靠的信息, 用以控制中药材质量^[21]。本研究所建立的 RP-HPLC-DAD 指纹图谱、HCA、PCA 以及 PLS-DA 的结果不仅可以为木豆叶的质量评价提供科学的方法, 也为其药效物质基础研究奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 季兴跃, 薛司徒, 李卓荣. 木豆叶主要活性成分及其药理作用的研究进展 [A] // 2010 年中国药学会暨第十届中国药师周论文集 [C]. 上海: 中国药学会, 2010: 1293-1301.
- [2] 郑菲艳, 鞠玉栋, 黄惠明, 等. 木豆及其开发利用价值 [J]. 福建农业科技, 2016(4): 65-68.
- [3] Lee B H, Lai Y S, Wu S C. Antioxidation, angiotensin converting enzyme inhibition activity, nattokinase, and antihypertension of *Bacillus subtilis* (natto)-fermented pigeon pea [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(4): 750-757.
- [4] 孔羽. 木豆叶中抗肿瘤活性成分的分离纯化及抗乳腺癌作用机制研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- [5] Qi X L, Li T T, Wei Z F, et al. Solvent-free microwave extraction of essential oil from pigeon pea leaves [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and evaluation of its antimicrobial activity [J]. *Ind Crops Prod*, 2014, 58: 322-328.
- [6] 田润, 尹爱武, 王盼. 木豆叶化学成分研究 [J]. 湖南科技学院学报, 2012, 33(4): 68-69.
- [7] Grover J K, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 81(1): 81-100.
- [8] 刘长河, 李华妮, 王艳艳, 等. 木豆叶芪类提取物对维甲酸所致大鼠骨质疏松的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(2): 287-290.
- [9] Xu H, Shen J G, Xiao J B, et al. Neuroprotective effect of cajanin stilbene acid against cerebral ischemia and reperfusion damages by activating AMPK/Nrf2 pathway [J]. *J Adv Res*, 2020, 34: 199-210.
- [10] Dai F J, Hsu W H, Huang J J, et al. Effect of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) on high-fat diet-induced hypercholesterolemia in hamsters [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 53: 384-391.
- [11] 王海英, 朱发伟. 木豆叶中牡荆苷的含量检测 [J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(3): 229-230.
- [12] 孙琳, 黄松, 赖小平. HPLC 法测定不同产地及品种木豆叶中牡荆苷的含量 [J]. 中药材, 2011, 34(1): 31-32.
- [13] 黄松, 孙琳, 赖小平, 等. 海南产木豆叶 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2011, 34(5): 699-702.
- [14] 胥爱丽, 毕晓黎, 李素梅, 等. 木豆叶 HPLC 指纹图谱建立及 2 种成分测定 [J]. 中成药, 2017, 39(7): 1435-1439.
- [15] 孙琳, 黄松, 赖小平, 等. 云南地区木豆叶的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2253-2255.
- [16] 郭红, 徐俊. 荭草苷药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(10): 5-6.
- [17] 魏薇. 负压空化辅助双水相提取富集木豆叶中四种主要成分工艺研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [18] 付丽楠. 木豆叶中球松素的超声提取工艺及其对成骨细胞 MC3T3-E1 作用研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [19] Xu H, Shen J G, Xiao J B, et al. Neuroprotective effect of cajanin stilbene acid against cerebral ischemia and reperfusion damages by activating AMPK/Nrf2 pathway [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 199-210.
- [20] Zhou J L, Qi L W, Li P. Quality control of Chinese herbal medicines with chromatographic fingerprint [J]. *Chin J Chromatogr*, 2008, 26(2): 153-159.
- [21] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 231-237.
- [22] 李妍, 何文媛, 王康宇, 等. 基于 HPLC 多指标成分测定及指纹图谱多模式识别方法的北细辛质量分析 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 238-243.

[责任编辑 时圣明]