

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 指纹图谱和多成分定量的不同产地辣木叶药材及其黄酮部位质量研究

袁 静¹, 袁永兵², 周 铭¹, 刘 越¹, 黄 雅¹, 王保锦¹, 常子豪¹, 刘宇琦¹, 胡 倩¹, 陈尹心¹, 周立鹏¹, 雒晓卫¹, 王树楷¹, 刘乡乡³, 张兰珍^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 天津药物研究院, 天津 300462

3. 广州泽力医药科技有限公司, 广东 广州 510663

摘要: 目的 建立不同产地辣木 *Moringa oleifera* 叶药材和黄酮部位 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 指纹图谱和多成分定量方法, 并进行化学计量学分析, 为辣木叶药材和黄酮部位的质量控制提供参考。方法 采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 检测并结合“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)”建立 15 个不同批次辣木叶药材和黄酮部位(S1~S15)指纹图谱, 并进行相似度评价和共有峰指认, 测定 3 个黄酮类成分异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷含量。采用聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)等化学计量学分析方法对 15 批不同产地辣木叶药材质量和黄酮部位进行评价。结果 15 批不同产地辣木叶药材标定了 17 个共有峰, 指认出其中 14 个共有峰; 辣木叶黄酮部位标定和指认出 10 个共有峰。15 批不同产地辣木叶和黄酮部位的相似度和 HCA 分析聚为 4 类, 且 HCA 结果与相似度评价结果基本相一致; PCA、OPLS-DA 分析聚为 3 类。15 批药材中异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的含量分别为 0.06%~0.19%、0.27%~0.79%、0.08%~0.23%; 黄酮部位中含量分别为 0.53%~3.53%、6.49%~14.36%、2.05%~4.66%。结论 建立了专属性强、灵敏度高的不同产地辣木叶药材和辣木叶黄酮部位的定性定量方法, 为辣木叶药材和辣木叶黄酮部位综合评价提供依据。

关键词: 辣木叶; 辣木叶黄酮部位; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; 指纹图谱; 化学计量学; 异牡荆素; 异槲皮苷; 紫云英苷

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)24-7897-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.027

Quality evaluation of *Moringa oleifera* leaves and its flavonoid fractions based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS fingerprint and multi-component quantitative analysis

YUAN Jing¹, YUAN Yong-bing², ZHOU Ming¹, LIU Yue¹, HUANG Ya¹, WANG Bao-jin¹, CHANG Zi-hao¹, LIU Yu-qi¹, HU Qian¹, CHEN Yin-xin¹, ZHOU Li-peng¹, LUO Xiao-wei¹, WANG Shu-kai¹, LIU Xiang-xiang³, ZHANG Lan-zhen¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. Guangzhou Zeli Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China

Abstract: Objective The UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS fingerprints of *Moringa oleifera* leaves and flavonoid fractions from different producing areas were established, and the chemometrics analysis and content determination of important components were carried out to provide reference for the quality control of *M. oleifera* leaves. **Methods** UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS combined with similarity evaluation system of TCM chromatogram fingerprint (2012 A edition) were used to establish fingerprint of 15 batches of *M. oleifera* leaves and flavonoid fractions from different producing areas (S1—S15). Common peaks were confirmed and their

收稿日期: 2022-06-25

基金项目: 北京中医药大学纵向科研发展基金项目(2022-ZXFZJJ-001)

作者简介: 袁 静, 女, 硕士研究生, 研究方向为药效物质基础及其药理作用。E-mail: yuanjing961103@163.com

*通信作者: 张兰珍, 研究员, 主要从事中药药效物质与质量控制工作。E-mail: zhanglanzhen01@126.com

similarities were evaluated, and the contents of the identified components were determined. Stoichiometric analysis methods such as hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the quality of 15 batches of *M. oleifera* leaves and flavonoid fractions from different producing areas. **Results** A total of 17 common peaks were identified in 15 batches of *M. oleifera* leaves from different producing areas, and 10 common peaks were identified in the flavonoid fraction of *M. oleifera* leaves. The similarity and HCA analysis of leaves and flavonoids of 15 batches of *M. oleifera* leaves from different producing areas were classified into four groups and the HCA results were basically consistent with the results of similarity evaluation. It was found that they were clustered into three categories by PCA and OPLS-DA analysis. The contents of isovitexin, isoquercitrin and astragalgin in 15 batches of medicinal materials were 0.06%—0.19%, 0.27%—0.79% and 0.08%—0.23%, respectively. The contents of isovitexin, isoquercitrin and astragalgin in flavonoid fractions were 0.53%—3.53%, 6.49%—14.36% and 2.05%—4.66%, respectively. **Conclusion** In this study, the qualitative and quantitative methods of flavonoids in leaves of *M. oleifera* from different producing areas with strong specificity and high sensitivity were established to provide a basis for the comprehensive evaluation of flavonoid fractions of leaves of *M. oleifera*.

Key words: leaves of *Moringa oleifera* Lam.; flavonoid fractions of leaves of *M. oleifera* Lam.; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; fingerprint; chemometrics; isovitexin; isoquercetin; astragalgin

辣木 *Moringa oleifera* Lam. 为辣木科辣木属多年生乔木，原产于印度和非洲的干旱或半干旱地区^[1-2]，于 20 世纪早期引进我国云南^[3-4]，目前在云南、海南、福建、广东、广西等地均有种植，已成为一种极具营养价值、药用价值和经济价值的植物，且在 2012 年被列为我国新资源食品原料^[5]。根据《印度阿育吠托药典》（*The Ayurvedic Pharmacopoeia of India*）中的记载，辣木叶味甘性凉，具有除风、消除脂肪、止痛、杀腹虫、润肤、明目、清脑等功效。具有良好的抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降糖、降压、调血脂等生物活性^[6]。辣木叶质量研究目前有辣木叶药材 HPLC 指纹图谱和含量测定^[7-8]，但对不同产地多批次药材及黄酮部位的 UPLC-MS 指纹图谱及黄酮多成分含量测定综合评价尚无报道。本研究建立了不同产地辣木叶药材和黄酮部位的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 指纹图谱，并进行化学计量学分析和主要黄酮成分含量测定，为辣木叶药材和黄酮部位的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity UPLC H-Class 液相色谱仪（包括 PDA 检测器，美国 Waters 公司）；DIONEX Ultimate 3000 超高效液相色谱系统，Q Exactive FOCUS 质谱仪（美国 Thermo Scientific 公司，配有电喷雾离子源 ESI 以及 Xcalibur 3.0 数据处理系统、Compound Discover 3.0 软件）；SECURA124-1CN 型电子天平（十万分之一，北京赛多利斯仪器系统有限公司）；KQ5200E 型超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试剂

对照品异牡荆素、异槲皮素、紫云英苷均为实

验室自制，质量分数均 >98%；甲醇、乙腈（美国 Fisher 公司，色谱纯）；磷酸（天津光复精细化工研究所，色谱纯）；甲酸（天津市大茂化学试剂厂，色谱纯）；超纯水。

15 批辣木叶产地来源见表 1。由北京中医药大学中药鉴定系刘春生教授鉴定均为辣木 *M. oleifera* Lam. 叶，样品保存于北京中医药大学中药学院中药化学实验室。

表 1 辣木叶产地来源

Table 1 Sources of leaves of *M. oleifera*

编号	产地	状态
S1	云南红河	干叶
S2	云南丽江花坪	干叶
S3	云南西双版纳曼噶俭村	干叶
S4	云南楚雄	干叶
S5	云南	干叶
S6	云南昆明东川区	干叶
S7	广东梅州	干叶
S8	广东河源	干叶
S9	广西	干叶
S10	四川凉山会东县	干叶
S11	四川凉山会东县	叶粉
S12	四川凉山会东县	叶粉
S13	印度	叶粉
S14	印度	叶粉
S15	云南中缅边境孟定	叶粉

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸溶液-乙腈, 药材梯度洗脱: 0~10 min, 3.0%~

6.0%乙腈; 10~11 min, 6.0%~10.5%乙腈; 11~20 min, 10.5%~16.5%乙腈; 20~28 min, 16.5%~27.0%乙腈; 黄酮部位梯度洗脱: 0~2 min, 3.0%~5.0%乙腈; 2~8 min, 5.0%~8.0%乙腈; 8.0~8.1 min, 8.0%~10.5%乙腈; 8.1~16.0 min, 10.5%~28.0%乙腈; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 5 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子化电离源 (ESI); 负极性毛细管电压 3.0 kV; 毛细管温度 320 °C; 检测模式: 负离子模式; 扫描范围: m/z 120~1800; 鞘气体积流量 35 arb; 辅助气体积流量 10 arb; 离子源温度 400 °C; 质谱分辨率 (70 000/17 500); 碰撞能量 (阶梯模式): 30、35、40 eV。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品牡荆素、异槲皮苷和紫云英苷适量, 加甲醇溶解稀释, 即得异牡荆素 (0.228 mg/mL)、异槲皮苷 (0.416 mg/mL)、紫云英苷 (0.169 mg/mL) 的对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备

(1) 药材供试品溶液制备: 称取 15 批辣木叶粉末 0.5 g, 精密称定, 分别置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 室温浸泡 30 min 后, 超声 60 min, 放至室温, 补足减失的质量, 滤过, 取续滤液即得辣木叶供试品溶液, 进样前过 0.22 μ m 微孔滤膜。

(2) 黄酮部位供试品溶液的制备: 称取 15 个不同批次的辣木叶粉, 70% 乙醇 70 °C 加热浸泡 2 h, 溶剂用量为 20 倍, 提取 2 次, 合并滤液后浓缩成质量浓度为 0.1 g 生药/mL 的药液, 离心, 上清液上样于 20 mL NKA-9 型大孔树脂, 上样 5 个柱体积, 进行动态吸附, 吸附体积流量 1 mL/min, 待吸附完成后, 用蒸馏水除杂 4 个柱体积, 除杂体积流量 1 mL/min, 洗脱剂为 60% 乙醇, 洗脱体积为 5 个柱体积, 洗脱体积流量为 1 mL/min, 收集 60% 乙醇洗脱液, 减压干燥即得辣木叶黄酮部位。称取黄酮部位 10 mg, 精密称定, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容, 即得黄酮部位供试液, 进样前过 0.22 μ m 微孔滤膜。

2.1.5 精密度试验 取批号药材 (S1) 及其黄酮部位供试品溶液, 按照“2.1.1”和“2.1.2”项下相应的条件进样测定, 分别连续进样 6 次, 以异槲皮苷峰 (药材为 11 号和黄酮部位为 D 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积并计算 RSD。药材相对保留时间的 RSD < 0.16%, 相对峰面积的 RSD < 3%; 黄酮部位相对保留时间的

RSD < 0.24%, 相对峰面积的 RSD < 3%; 且药材各谱图相似度均在 0.999 以上, 黄酮部位各谱图相似度均为 1.0, 符合指纹图谱技术要求, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取批号 S1 的药材和黄酮部位, 按照“2.1.4”项下供试液制备方法各平行制备 6 份, 按照“2.1.1”和“2.1.2”项下相应的条件进样测定, 以异槲皮苷峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积并计算 RSD。药材相对保留时间的 RSD < 0.21%, 相对峰面积的 RSD < 3%; 黄酮部位相对保留时间的 RSD < 0.13%, 相对峰面积的 RSD < 2.6%; 且药材各谱图相似度均在 0.999 以上, 黄酮部位各谱图相似度均为 1.0, 符合指纹图谱技术要求, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取批号 S1 的药材和黄酮部位供试品溶液, 按照“2.1.1”和“2.1.2”项下相应的条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 以异槲皮苷峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积并计算 RSD。药材相对保留时间的 RSD < 0.43%, 相对峰面积的 RSD < 3%; 部位相对保留时间的 RSD < 0.48%, 相对峰面积的 RSD < 1.25%; 且药材各谱图相似度均 \geq 0.999, 黄酮部位各谱图相似度均为 1.0, 符合指纹图谱技术要求, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 指纹图谱的建立及主要共有峰的指认 分别取 15 批辣木叶药材和黄酮部位样品溶液, 按照“2.1.1”项和“2.1.2”项下条件进样测定, 将各样品负离子模式下基峰离子流色谱图 (base peak chromatogram, BPC) 的原始数据积分后以 AIA 格式输出, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 A 版)”, 以 S1 号样品色谱图为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗宽度为 0.1, 生成特征图谱, 经过多点校正和自动匹配, 得到辣木叶药材和黄酮部位的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 指纹图谱叠加图及对照图谱 (R), 其中, 标定出药材 17 个共有峰, 指认了 14 个峰, 各样品图谱见图 1 和对照图谱见图 2, 鉴定结果见表 2; 黄酮部位 10 个共有峰, 指认了 10 个峰, 样品图谱见图 3, 对照图谱见图 4, 鉴定结果见表 3。

2.1.9 指纹图谱相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 A 版)”对辣木叶药材及黄酮部位指纹图谱进行相似度评价, 以 S1 为参照图谱, 由于 11 号和 D 号异槲皮苷色谱峰的分离

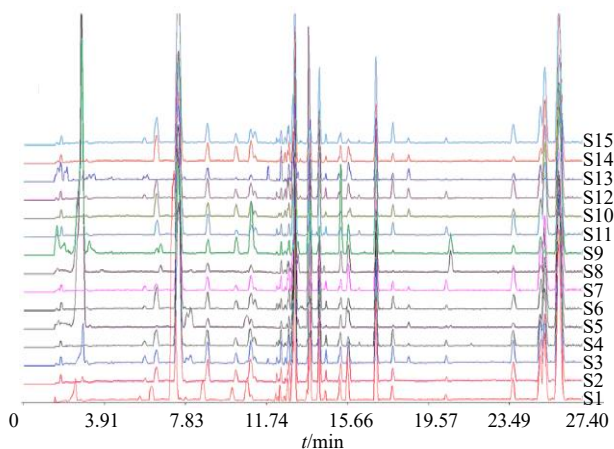


图 1 15 批辣木叶药材 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 叠加图谱

Fig.1 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS spectrum of 15 batches of leaves of *M. oleifera*

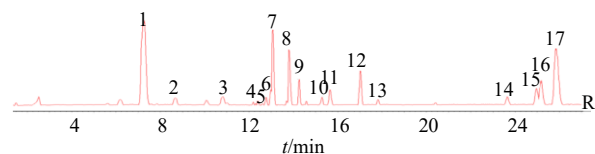


图 2 15 批辣木叶药材 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 对照指纹图谱

Fig. 2 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS reference fingerprint of 15 batches of leaves of *M. oleifera*

度、峰形均较好且峰面积稳定, 所以选其作为参照峰, 计算得到的 15 批辣木叶药材和黄酮部位的共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果表明显示, 共有峰的相对保留时间的 RSD < 3%, 相对峰面积的 RSD 差异较大, 说明不同产地辣木叶所含成分的含量存在较大差异。相似度评价结果 (表 4、5) 表明, 除 S8 和 S9 2 批的相似度小于 0.85 外, 其余辣木叶药材的相似度均在 0.9 以上, 而

表 2 不同批次辣木叶药材共有峰鉴定结果

Table 2 Identification results of common peaks in different batches of leaves of *M. oleifera*

峰号	t_R /min	化合物	分子式	模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片 (m/z)
1	7.28	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-H	353.087 8	353.087 7	2.921	191.055 2, 179.034 1, 161.023 4, 135.043 9
2	8.67	marumosiide B	C ₂₀ H ₂₉ NO ₁₁	-H	458.166 7	458.166 9	2.713	504.172 5, 307.103 6, 150.054 9
3	10.83	4-对香豆酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	-H	337.092 8	337.093 3	4.527	337.093 3, 163.039 0
4	12.45	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	-H	179.034 9	179.034 0	0.976	133.028 0, 108.020 5
5	12.59	3-咖啡酰奎宁酸甲酯	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	-H	367.103 4	367.103 4	2.725	193.050 1, 134.036 2
6	12.77	4-阿魏基奎宁酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	-H	367.103 4	367.103 4	2.891	193.049 9, 134.036 0
7	13.08	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-H	353.087 8	353.087 9	3.516	191.055 3, 161.023 4, 135.043 9
8	13.80	3-对香豆酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	-H	337.092 8	337.093 1	3.993	337.092 8, 163.039 1
9	14.27	8-O-乙酰山柃苷甲酯	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₂	-H	447.150 7	447.150 8	2.566	269.103 1
10	15.29	异牡荆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-H	431.098 7	431.097 3	3.250	269.045 6, 311.056 5, 341.066 8, 353.066 7, 413.088 4
11	15.64	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-H	463.088 1	463.088 3	2.759	463.088 3, 301.034 1, 283.052 2
12	17.20	山柃酚-3-O-芸香苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-H	593.151 2	593.151 3	2.046	593.151 3, 575.132 3, 287.067 0
13	17.83	紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-H	447.093 7	447.092 2	3.36	225.927 3, 255.031 6, 285.038 9
14	23.64	山柃酚-7-O- α -L-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-H	431.098 3	431.098 6	3.078	431.098 6, 267.051 3, 163.026 4

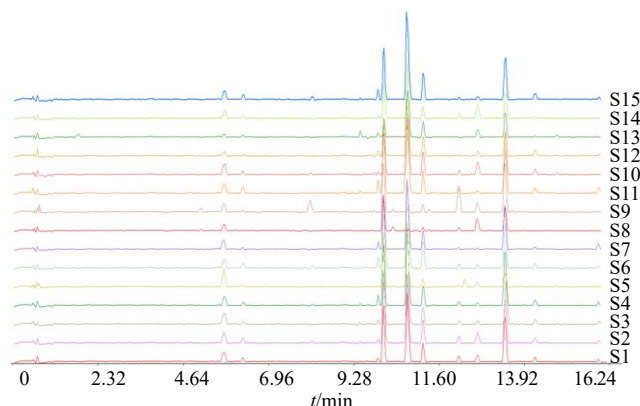


图 3 15 批辣木叶黄酮部位 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 叠加图谱

Fig. 3 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS superposition map of flavonoid fractions in 15 batches of leaves of *M. oleifera*

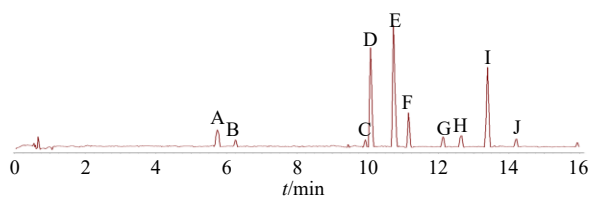


图 4 15 批辣木叶黄酮部位 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 对照指纹图谱

Fig. 4 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS reference fingerprint of flavonoid fractions in 15 batches of leaves of *M. oleifera*

15 批辣木叶黄酮部位除 S9 的相似度是 0.893, 剩余 14 批的相似度均在 0.9 以上, 说明辣木叶不同产地不同批次的辣木叶药材的整体质量具有较好

表3 不同批次辣木叶黄酮部位共有峰鉴定结果

Table 3 Identification results of common peaks in different batches of flavonoid fractions of leaves of *M. oleifera*

峰号	t_R/min	化合物	分子式	模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片 (m/z)
A	5.40	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	M-H	353.087 8	353.088 3	4.564	191.056 2, 179.035 1, 161.024 5, 135.045 2
B	6.25	marumosiide B	C ₂₀ H ₂₉ NO ₁₁	M-H	458.166 7	458.167 0	2.975	504.172 9, 307.103 8, 150.054 9
C	9.82	异牡荆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	M-H	431.098 7	431.097 3	3.250	269.045 6, 311.056 5, 341.066 8, 353.066 7, 413.088 4
D	10.08	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	M-H	463.088 1	463.088 3	2.759	463.088 3, 301.034 1, 283.052 2
E	10.73	3-对香豆酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	M-H	337.092 8	337.093 1	3.904	337.093 1, 163.038 9
F	11.11	紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	M-H	447.093 7	447.092 6	2.460	225.927 5, 255.031 8, 285.038 6
G	12.13	5-对香豆酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	M-H	337.092 8	337.093 0	3.637	337.093 0, 163.038 9
H	12.62	niazirin	C ₁₄ H ₁₇ NO ₅	M-H	278.103 3	278.103 1	3.060	324.108 9, 146.882 6
I	13.39	维采宁-2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	M-H	593.151 2	593.151 6	2.653	593.151 6, 575.132 3, 353.067 0
J	14.22	儿茶酚	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	M+HCOO ⁻	335.077 2	335.077 6	4.465	335.077 6, 146.937 4, 137.023 2, 133.028 2

表4 15批辣木叶药材相似度评价

Table 4 Similarity evaluation of 15 batches of leaves of *M. oleifera*

批号	相似度															对照
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
S1	1.000	1.000	0.998	0.988	0.930	0.988	0.995	0.702	0.760	0.994	0.975	0.977	0.869	0.968	0.981	0.990
S2	1.000	1.000	0.998	0.988	0.925	0.988	0.994	0.693	0.752	0.993	0.977	0.976	0.865	0.970	0.981	0.988
S3	0.998	0.998	1.000	0.993	0.932	0.993	0.995	0.712	0.767	0.992	0.977	0.981	0.885	0.974	0.986	0.993
S4	0.988	0.988	0.993	1.000	0.926	0.997	0.991	0.698	0.758	0.985	0.987	0.985	0.891	0.986	0.995	0.992
S5	0.930	0.925	0.932	0.926	1.000	0.913	0.948	0.888	0.889	0.918	0.905	0.926	0.904	0.900	0.934	0.958
S6	0.988	0.988	0.993	0.997	0.913	1.000	0.989	0.678	0.740	0.988	0.990	0.991	0.897	0.990	0.994	0.990
S7	0.995	0.994	0.995	0.991	0.948	0.989	1.000	0.729	0.781	0.994	0.975	0.987	0.889	0.969	0.989	0.995
S8	0.702	0.693	0.712	0.698	0.888	0.678	0.729	1.000	0.950	0.682	0.649	0.701	0.834	0.659	0.707	0.767
S9	0.760	0.752	0.767	0.758	0.889	0.740	0.781	0.950	1.000	0.747	0.705	0.761	0.841	0.715	0.766	0.816
S10	0.994	0.993	0.992	0.985	0.918	0.988	0.994	0.682	0.747	1.000	0.968	0.986	0.876	0.963	0.983	0.986
S11	0.975	0.977	0.977	0.987	0.905	0.990	0.975	0.649	0.705	0.968	1.000	0.978	0.875	0.997	0.990	0.978
S12	0.977	0.976	0.981	0.985	0.926	0.991	0.987	0.701	0.761	0.986	0.978	1.000	0.916	0.979	0.992	0.988
S13	0.869	0.865	0.885	0.891	0.904	0.897	0.889	0.834	0.841	0.876	0.875	0.916	1.000	0.894	0.899	0.920
S14	0.968	0.970	0.974	0.986	0.900	0.990	0.969	0.659	0.715	0.963	0.997	0.979	0.894	1.000	0.988	0.977
S15	0.981	0.981	0.986	0.995	0.934	0.994	0.989	0.707	0.766	0.983	0.990	0.992	0.899	0.988	1.000	0.992
对照	0.990	0.988	0.993	0.992	0.958	0.990	0.995	0.767	0.816	0.986	0.978	0.988	0.920	0.977	0.992	1.000

表5 15批辣木叶黄酮部位相似度评价

Table 5 Similarity evaluation of flavonoid fractions in 15 batches of leaves of *M. oleifera*

批号	相似度															对照
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
S1	1.000	0.999	0.994	0.992	0.951	0.992	0.994	0.892	0.874	0.984	0.981	0.989	0.971	0.978	0.996	0.998
S2	0.999	1.000	0.993	0.991	0.953	0.991	0.992	0.897	0.876	0.986	0.978	0.986	0.972	0.973	0.995	0.998
S3	0.994	0.993	1.000	0.994	0.955	0.981	0.981	0.918	0.879	0.962	0.975	0.980	0.981	0.979	0.985	0.995
S4	0.992	0.991	0.994	1.000	0.957	0.985	0.983	0.912	0.890	0.962	0.979	0.974	0.967	0.979	0.991	0.996
S5	0.951	0.953	0.955	0.957	1.000	0.927	0.937	0.940	0.878	0.910	0.937	0.925	0.916	0.913	0.951	0.959
S6	0.992	0.991	0.981	0.985	0.927	1.000	0.989	0.856	0.860	0.986	0.983	0.973	0.955	0.980	0.995	0.990
S7	0.994	0.992	0.981	0.983	0.937	0.989	1.000	0.850	0.840	0.985	0.986	0.993	0.948	0.978	0.995	0.990
S8	0.892	0.897	0.918	0.912	0.940	0.856	0.850	1.000	0.938	0.838	0.830	0.846	0.927	0.829	0.873	0.908
S9	0.874	0.876	0.879	0.890	0.878	0.860	0.840	0.938	1.000	0.852	0.807	0.820	0.903	0.807	0.867	0.893
S10	0.984	0.986	0.962	0.962	0.910	0.986	0.985	0.838	0.852	1.000	0.956	0.973	0.945	0.947	0.983	0.978
S11	0.981	0.978	0.975	0.979	0.937	0.983	0.986	0.830	0.807	0.956	1.000	0.977	0.927	0.993	0.988	0.980
S12	0.989	0.986	0.980	0.974	0.925	0.973	0.993	0.846	0.820	0.973	0.977	1.000	0.953	0.976	0.981	0.982
S13	0.971	0.972	0.981	0.967	0.916	0.955	0.948	0.927	0.903	0.945	0.927	0.953	1.000	0.941	0.953	0.974
S14	0.978	0.973	0.979	0.979	0.913	0.980	0.978	0.829	0.807	0.947	0.993	0.976	0.941	1.000	0.979	0.977
S15	0.996	0.995	0.985	0.991	0.951	0.995	0.995	0.873	0.867	0.983	0.988	0.981	0.953	0.979	1.000	0.996
对照	0.998	0.998	0.995	0.996	0.959	0.990	0.990	0.908	0.893	0.978	0.980	0.982	0.974	0.977	0.996	1.000

的一致性，而 S8 和 S9 2 批药材可能由于环境因素或者加工、储存、运输方式的原因，造成药材质量不稳定，相似度较差。但是辣木叶经过提取纯化工艺制备后，黄酮部位的相似度基本一致，整体质量达到基本一致。

2.2 化学计量学分析

2.2.1 聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)

利用 SAS 8.2 将 15 批辣木叶药材共有峰的峰面积进行 HCA，采用组间连接法，以平方欧氏距离作为样品测度进行 HCA 可知，15 批辣木叶药材可聚为 4 类：S5、S13 聚为一类，S8、S9 聚为一类，S1~S4 聚为一类，S6~S12、S14、S15 聚为一类。HCA 与相似度评价结果基本一致。

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

将 15 批辣木叶的 17 个共有峰的相对峰面积导入 SIMCA 14.1 软件，采用非监督模式识别法进行 PCA，并绘制 PCA 得分散点图，见图 5。15 批辣木叶药材可聚为 3 类：S9、S13 聚为一类，S8、S5 聚为一类，S1~S4、S5~S10、S11、S12、S14、S15 聚为一类。与相似度评价和 HCA 分析结果基本一致，说明可以将不同产地辣木叶化学特征性成分的差异性通过指纹图谱的差异性来反映。

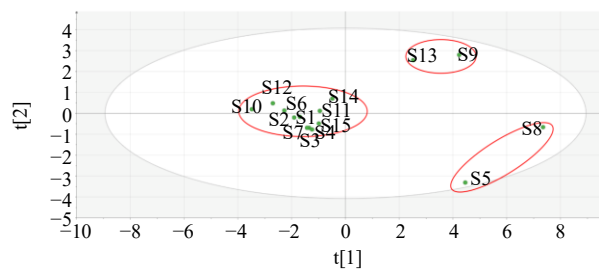


图 5 15 批辣木叶药材 PCA 得分散点图

Fig. 5 Distribution points of PCA in 15 batches of leaves of *M. oleifera*

2.2.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)

为了更准确地反映 15 批辣木叶药材的成分差异，基于 PCA 的结果，采用监督模式识别法进行 OPLS-DA，绘制 OPLS-DA 模型得分图，见图 6。15 批辣木叶药材可聚为 3 类，与 PCA 结果一致。OPLS-DA 模型的主成分回归系数 $R^2_X=0.986$ ， $R^2_Y=0.612$ ，模型预测参数 $Q^2=0.559$ ，全部大于 0.5，说明建立的模型稳定且预测能力强。通过模型变量投影重要性 VIP 值筛选 15 批辣木叶的差异化学成分，VIP 值越大，表明变量离 X 轴越远，该色谱峰对分类的贡

献越大，如图 7 所示，以 $VIP>1$ 为显著影响， $VIP>1$ 的峰按照大小排序有 17、5、15、4、6、3、12 号峰，剩余色谱峰的 VIP 至均小于 1，对于分类贡献不大。

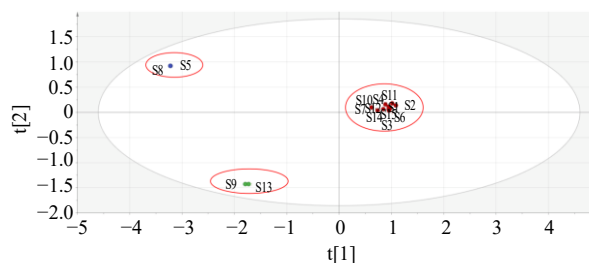


图 6 15 批辣木叶药材 OPLS-DA 得分散点图

Fig. 6 Distribution points of OPLS-DA of 15 batches of leaves of *M. oleifera*

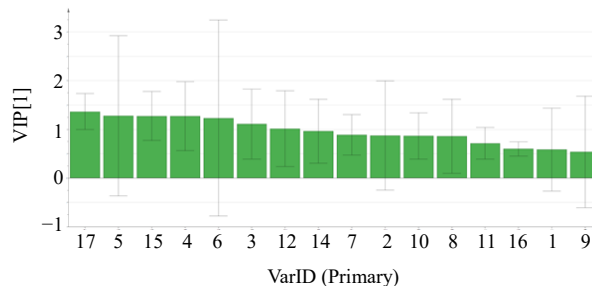


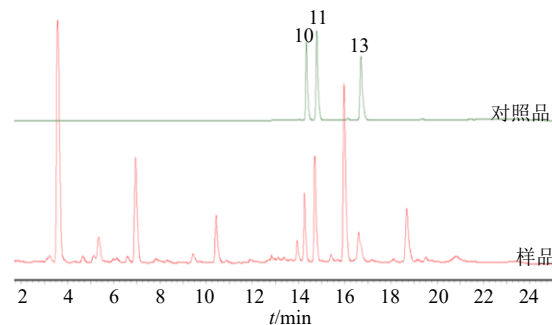
图 7 差异性化学成分 VIP 图

Fig. 7 VIP plot of differential markers

2.3 黄酮类成分的含量测定

2.3.1 专属性考察

取“2.1.3”项下对照品溶液及“2.1.4”项下供试品溶液，按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条进样分析，供试品色谱在与对照品色谱相应的保留时间处有相同的色谱峰，说明该方法专属性良好，色谱图见图 8。



10-异牡荆素 11-异槲皮苷 13-紫云英苷
10-isovitexin 11-isoquercetin 13-astragalins

图 8 专属性考察结果

Fig. 8 Specific investigation results

2.3.2 线性关系考察 取 3 种对照品溶液各 5.0 mL，混合均匀，定量稀释成分别含有异牡荆素 7.60、9.50、15.20、19.00、38.00、76.00 $\mu\text{g/mL}$ ，异槲皮苷 13.87、17.33、27.73、34.67、69.33、138.67 $\mu\text{g/mL}$ ，紫云英苷

5.64、7.05、11.28、14.10、28.20、56.40 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，按照“2.1.1”和“2.1.2”项下相应的色谱条件进样测定分析，以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，结果见表 6。

表 6 3 种成分的线性关系考察结果

Table 6 Results of linear relationship investigation of three components

测定样品	成分	线性方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
辣木叶药材	异牡荆素	$Y=20\ 075 X-16\ 707$	0.999 5	7.60~76.00
	异槲皮苷	$Y=12\ 004 X-12\ 395$	0.999 7	13.87~138.67
	紫云英苷	$Y=12\ 070 X-2\ 152.1$	1.000 0	5.64~56.40
黄酮部位	异牡荆素	$Y=21\ 288 X-19\ 062$	0.999 5	7.60~76.00
	异槲皮苷	$Y=14\ 470 X-17\ 824$	0.999 7	13.87~138.67
	紫云英苷	$Y=14\ 907 X-2\ 941.7$	1.000 0	5.64~56.40

2.3.3 精密度试验 取批号 S1 的辣木叶药材和黄酮部位供试品溶液，按照“2.1.1”和“2.1.2”项下相应的色谱条件进样测定，分别连续进样 6 次，记录峰面积。结果显示，药材异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷峰面积的 RSD 分别为 0.37%、0.28%、0.85%；黄酮部位异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷峰面积的 RSD 分别为 0.38%、0.43%、0.54%。

2.3.4 重复性试验 取批号 S1 的辣木叶药材和黄酮部位，按照“2.1.4”项下供试液制备方法各平行制备 6 份，按照“2.1.1”和“2.1.2”项下相应的色谱条件进样测定，计算待测成分含量。结果显示，药材中药材异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的平均质量分数分别为 0.14%、0.38%、0.19%，RSD 分别为 0.49%、0.32%、0.71%；黄酮部位中药材异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的平均质量分数分别为 2.81%、12.00%、4.22%，RSD 分别为 0.39%、1.09%、0.61%。

2.3.5 稳定性试验 取批号 S1 的辣木叶药材和黄酮部位供试品溶液，按照“2.1.1”和“2.1.2”项下相应的色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录峰面积。辣木叶药材异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷峰面积的 RSD 分别为 1.71%、4.88%、2.73%；黄酮部位异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷峰面积的 RSD 分别为 0.84%、0.49%、1.04%。

2.3.6 加样回收率试验 取批号 S1 的辣木叶粉末 250 mg，精密称定，共 6 份，分别加入混合对照溶液（含有异牡荆素 0.380 mg/mL、异槲皮苷 0.986 mg/mL、紫云英苷 0.520 mg/mL）1 mL，精密量取，分别置于 100 mL 锥形瓶中，加入 50% 甲醇 49 mL，摇匀，称定质量，按照“2.1.4”项下制备供试液，按照“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件

进样测定，计算加样回收率以及 RSD。结果表明药材异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的平均加样回收率分别为 100.6%、100.6%、101.4%，RSD 分别为 1.70%、0.78%、1.35%。

取批号 S1 的黄酮部位 5 mg，精密称定，共 6 份，分别精密加入混合对照品溶液（含有异牡荆素 0.144 mg/mL、异槲皮苷 0.612 mg/mL、紫云英苷 0.222 mg/mL 的混合对照品溶液）1 mL，置于 25 mL 量瓶中，加 50% 甲醇溶解并定容，摇匀，按照“2.1.4”项下制备供试液，按照“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率以及 RSD。结果表明黄酮部位异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的平均加样回收率分别为 100.8%、100.2%、101.1%，RSD 分别为 1.31%、1.64%、1.85%。

2.3.7 样品含量测定 取 15 批辣木叶药材粉末 0.5 g 和黄酮部位 5.0 mg，精密称量，平行制备 3 份，按照“2.1.4”项下方法制备得到供试液，并在“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件进样检测，计算异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的含量。15 批辣木叶药材中异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的平均质量分数分别为 0.13%、0.44%、0.17%；质量分数分布在 0.06%~0.19%、0.27%~0.79%、0.49%~1.08%，黄酮部位中异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的平均质量分数分别为 2.3%、10.9%、3.43%，质量分数分布在 0.53%~3.53%、6.49%~14.36%、2.05%~4.66%，见表 7。由此可见，不同产地不同批次辣木叶中上述 3 中成分的含量差异明显。

3 讨论

本研究建立了不同产地辣木叶药材和辣木叶黄酮部位的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 指纹图谱，分别指认 14 个和 10 个共有峰。不同产地的辣木叶

表 7 15 批辣木叶药材及黄酮部位中 3 种成分的平均含量 ($n = 3$)Table 7 Average contents of three components in 15 batches of *M. oleifera* leaves and flavonoid fractions ($n = 3$)

类型	编号	质量分数/%			
		异牡荆素	异槲皮苷	紫云英苷	3 者之和
药材	S1	0.15	0.40	0.21	0.76
	S2	0.14	0.38	0.19	0.71
	S3	0.13	0.49	0.24	0.86
	S4	0.13	0.41	0.17	0.70
	S5	0.17	0.59	0.16	0.92
	S6	0.11	0.32	0.16	0.60
	S7	0.19	0.39	0.19	0.76
	S8	0.06	0.79	0.23	1.08
	S9	0.06	0.78	0.23	1.07
	S10	0.16	0.27	0.17	0.60
	S11	0.13	0.30	0.06	0.49
	S12	0.17	0.31	0.17	0.66
	S13	0.05	0.40	0.20	0.65
	S14	0.11	0.37	0.09	0.57
	S15	0.16	0.38	0.08	0.62
黄酮部位	S1	2.83	12.16	4.28	19.27
	S2	2.90	12.65	4.66	20.21
	S3	2.19	14.36	4.65	21.20
	S4	2.51	14.29	3.49	20.28
	S5	2.73	10.87	2.05	15.65
	S6	2.16	10.49	3.43	16.09
	S7	3.53	10.98	3.47	17.97
	S8	0.53	8.69	2.40	11.62
	S9	0.95	12.14	3.30	16.39
	S10	3.29	9.65	4.59	17.53
	S11	2.49	9.59	2.36	14.44
	S12	2.88	8.84	3.48	15.20
	S13	0.56	6.49	3.03	10.08
	S14	2.03	11.15	3.11	16.29
	S15	2.90	11.09	3.19	17.17

和黄酮部位的相似度分别为 0.767~0.995 和 0.893~0.998, 不同产地的辣木叶药材化学成分含量差异较大, 而富集纯化后的黄酮部位相似度差异明显变小。测定了不同产地辣木叶药材和辣木叶黄酮部位中异牡荆素、异槲皮苷、紫云英苷的含量, 可为辣木叶药材和黄酮部位的质量控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Stohs S J, Hartman M J. Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera* [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(6): 796-804.
- [2] Liu Y, Wang X Y, Wei X M, et al. Values, properties and utility of different parts of *Moringa oleifera*: An overview [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(4): 371-378.
- [3] Miettinen D J. Free amino acids and carotenes in the leaves of *Moringa oleifera* [J]. *Current Sci*, 1965, 34(12): 374-375.
- [4] Ramiah N N G A. Amino acids and sugars in the flowers and fruits of *Moringa oleifera* Lam. (Syn. *Moringa pterygosperma* Gaertn) [J]. *J Inst Chem*, 1977, 49(3): 163-165.
- [5] 刘凤霞, 王苗苗, 赵有为, 等. 辣木中功能性成分提取及产品开发生的研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36(19): 282-286.
- [6] 袁静, 梁文仪, 袁永兵, 等. 辣木叶化学成分和药理活性的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4422-4432.
- [7] 段海霞, 刘常青, 唐晓纯, 等. 不同产地辣木叶 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *食品与药品*, 2020, 22(3): 175-179.
- [8] 许琳, 范春林, 黄晓君, 等. 辣木叶的 UPLC 特征指纹图谱研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(22): 4474-4478.
- [9] 曾明莹, 傅咏梅, 张蜀, 等. 不同产地辣木叶提取物的含量测定及指纹图谱相似性评价 [J]. *云南农业大学学报: 自然科学*, 2018, 33(3): 485-493.
- [10] 金玲, 娄涛涛, 刘旋, 等. 辣木叶的 HPLC 指纹图谱 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(8): 86-91.
- [11] 肖丹, 范东生, 刘星, 等. 不同产地铁线蕨药材指纹图谱的建立、分析及差异成分的含量测定 [J]. *中国药房*, 2021, 32(17): 2085-2090.

[责任编辑 时圣明]