

不同产地桑叶氨基酸、核苷、生物碱成分的含量测定及多元统计分析

陆城宇^{1,2}, 李俊松^{1,2}, 狄留庆^{1,2*}, 赵永贵³, 李万红⁴(1.南京中医药大学, 南京 210023; 2.江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 南京 210023; 3.青海源兴工贸有限公司, 西宁 810000; 4.海安市中医院, 江苏 海安 226600)

摘要: 目的 建立超高效液相串联三重四极杆质谱(UPLC-TQD)同时测定桑叶样品中氨基酸、核苷及生物碱[1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)]含量的方法, 并采用多元统计分析方法分析比较不同产地桑叶中成分含量差异, 为桑叶资源的品质评价提供科学依据。方法 采用 Waters Acquity UPLC BEH Amide(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱, 以 0.2% 甲酸乙腈(A)-0.2% 甲酸水(B)梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C; 使用多反应监控正离子模式测定; 采用多元统计分析如主成分分析对不同产地桑叶进行综合性评价。结果 22 种成分的浓度与峰面积呈良好的线性关系($r^2 \geq 0.9903$); 方法精密度、重复性及稳定性的 RSD 值均 $\leq 7.5\%$; 平均加样回收率为 86.7%~106.4%, RSD 为 2.2%~8.9%。不同产地桑叶中氨基酸、核苷及 DNJ 存在一定差异, 结合多元统计分析, 共找出 8 个差异性成分, 可将样品分成 2 组。结论 所建立方法准确可靠, 结合 DNJ 及 8 个差异性成分含量进行比较, 湖北及江西产地的桑叶品质较优。

关键词: 桑叶; 氨基酸; 核苷; 1-脱氧野尻霉素; 主成分分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)09-1052-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.006

引用本文: 陆城宇, 李俊松, 狄留庆, 等. 不同产地桑叶氨基酸、核苷、生物碱成分的含量测定及多元统计分析[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1052-1057.

Determination and Multivariate Statistical Analysis of Amino Acids, Nucleosides and Alkaloid in Mulberry Leaves from Different Origins

LU Chengyu^{1,2}, LI Junsong^{1,2}, DI Liuqing^{1,2*}, ZHAO Yonggui³, LI Wanhong⁴(1.Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2.Jiangsu Provincial TCM Engineering Technology Research Center of Highly Efficient Drug Delivery System, Nanjing 210023, China; 3.Qinghai Yuanxing Industry, Xining 810000, China; 4.Hai'an Hospital of Chinese Medicine, Hai'an 226600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of amino acids, nucleosides and alkaloid [1-deoxynojirimycin(DNJ)] in mulberry leaves from different origins by UPLC-TQD, multivariate statistical analysis is employed to analysis discrepancies in compositions from these samples, to provide scientific basis for quality evaluation of mulberry leaf resources. **METHODS** Waters Acquity UPLC BEH Amide(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column was employed, 0.2% formic acid-acetonitrile(A)-0.2% formic acid-water(B) was served as the mobile phase, gradient elution, flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, column temperature was set at 35 °C. Multiple reaction monitoring and positive ions mode was used to detect ions. Comprehensive evaluation of mulberry leaves from different areas were subjected to multivariate statistical analysis such as principal component analysis, etc. **RESULTS** The concentration of 22 components showed a good linear relationship consistent with the peak areas($r^2 \geq 0.9903$). The RSD values of the precision, reproducibility and stability of the method were $\leq 7.5\%$. Moreover, the average sample recovery rate was 86.7%–106.4% and the corresponding RSD was 2.2%–8.9%. Mulberry leaves from different origins revealed great differences in amino acids, nucleosides and DNJ, combined with multivariate statistical analysis, these samples could be divided into two groups based on the discovered 8 most inhomogeneous componeous. **CONCLUSION** The method is accurate and reliable, combined with DNJ and 8 different components, mulberry leaves from Hubei and Jiangxi are deemed to be better.

KEYWORDS: mulberry leaves; amino acids; nucleosides; 1-deoxynojirimycin; principal component analysis(PCA)

桑叶为桑科桑属植物桑(*Morus alba* L.)的树叶, 其药用首载于《神农本草经》, 能下气益阴, 又能止咳, 有补益之功, 是中医清热解毒之要药。

现代药理研究表明桑叶具有抑制血糖上升, 防治糖尿病的功效, 其药效成分主要为桑叶中的生物碱类如 1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin,

基金项目: 江苏省重点研发专项资金项目(BF2016004); 青海省星火计划项目(2014-NS-306)

作者简介: 陆城宇, 男, 硕士生 Tel: 13912854589 E-mail: 1976750934@qq.com *通信作者: 狄留庆, 男, 博士, 教授 Tel: (025)85811521 E-mail: diliuqing928@163.com

DNJ)^[1-3]。中国药典 2015 年版使用芦丁对桑叶进行品质评价^[4]，而芦丁广泛存在于各种植物，采用芦丁评价不能有效地结合临床效果区分不同产地桑叶的品质。氨基酸和核苷是参与生命活动的小分子物质，其中氨基酸具有营养支持、免疫调节及抗肿瘤等作用；核苷具有抗病毒、改善脑细胞代谢、中枢神经镇静等作用^[5-7]，结合桑叶中的功效性成分生物碱(DNJ)，本研究建立超高效液相-三重四级杆质谱联用(UPLC-TQD)同时测定包括氨基酸、核苷及 DNJ 在内的 22 种小分子成分的方法，并对国内 6 个省份内采集的桑叶进行分析比较，利用主成分分析(PCA)法^[8]对不同产地样品进行综合评价，为评价不同地区的桑叶品质提供参考。

1 仪器与试剂

Waters UPLC/ZEVO-TQD/QCA138 液质联用系统(美国 Waters); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); XP6 百万分之一天平(Mettler Toledo AG); FA1204B 万分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司); MicroCL 21R 型微量台式离心机(Thermo); Milli-Q 超纯水系统(Millipore 公司)。

苯丙氨酸(PHE, 批号: H20N8H48638)、赖氨酸(LYS, 批号: S26A8I34751)、甲硫氨酸(MET, 批号: SLBK1770V)、亮氨酸(LEU, 批号: S05M8I35309)、苏氨酸(THR, 批号: S01F4G1)、缬氨酸(VAL, 批号: S06D8I49809)、异亮氨酸(ILE, 批号: SM0503GD13)、组氨酸(HIS, 批号: Z19A9H59384)、丙氨酸(ALA, 批号: S20A6G17672)、谷氨酸(GLU, 批号: S27M6G1)、精氨酸(ARG, 批号: MKBD3032V)、酪氨酸(TYR, 批号: SM0503GE13)、脯氨酸(PRO, 批号: S30J6G1)、丝氨酸(SER, 批号: S04J9I51507)、天冬酰胺(ASN, 批号: SM0506GA13)、天冬氨酸(ASP, 批号: S24A8I34463)、甘氨酸(GLY, 批号: SM0315GA14)、色氨酸(TRY, 批号: S02D7I26049), 纯度均 $\geq 98\%$, 均购自上海源叶生物科技有限公司; 胞苷(批号: JBZ-0131)、尿苷(批号: JBZ-0872)、鸟苷(批号: JBZ-0868)、DNJ(批号: JBZ-1213), 质量分数均 $\geq 98\%$, 均购自南京金益柏生物技术有限公司; 乙腈、甲酸均为质谱纯, 购自德国 Merck 公司; 水为超纯水, 实验室自制; 其余试剂均为分析纯。

桑叶样品实地采集于南京(S1)、天津(S2)、江

西(S3)、湖南(S4)、浙江(S5)、湖北(S6), 每个产地采集样品 3 份。样品收集完毕后统一处理: 清除杂质粗梗, 洗净, 60 °C 烘干, 粉碎后过 100 目筛。所有样品均经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为桑科桑属植物桑(*Morus alba* L.)的树叶。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH Amide(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)色谱柱; 流动相: 0.2% 甲酸乙腈(A)-0.2% 甲酸水(B), 梯度洗脱(0~3 min, 10%B; 3~9 min, 10% $\rightarrow$ 18%B; 9~18 min, 18% $\rightarrow$ 20%B; 18~23 min, 20% $\rightarrow$ 46%B; 23~24 min, 46% $\rightarrow$ 10%B; 24~25 min, 10%B); 柱温 35 °C, 流速 0.4 mL $\cdot$ min⁻¹, 进样量 4 μ L。

2.1.2 质谱条件 离子化模式 ESI⁺; 采集方式为多反应监控(multiple reaction monitoring, MRM); 脱溶剂温度为 350 °C; 氮气流量 650 L $\cdot$ h⁻¹、氩气 1 L $\cdot$ h⁻¹。22 种成分的质谱优化参数见表 1。

表 1 质谱条件优化参数

Tab. 1 MS optimization parameters

化合物	保留时间/min	离子对(<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞能量/V
PHE	2.34	165.91/102.90	20	24
LYS	16.59	146.90/83.98	20	16
MET	2.90	149.86/104.46	20	14
LEU	2.02	131.88/43.99	20	18
THR	6.31	119.90/55.98	18	14
VAL	2.66	117.86/54.94	18	20
ILE	2.06	131.88/43.96	18	20
HIS	15.98	155.93/82.71	24	26
ALA	4.00	89.87/44.02	18	26
GLU	6.63	147.91/83.93	18	16
ARG	15.47	174.98/69.98	28	22
TYR	3.56	181.97/90.94	20	26
PRO	3.31	115.91/116.62	22	16
SER	7.87	105.87/69.84	6	10
ASN	8.71	132.90/73.92	18	16
ASP	7.67	133.88/73.92	18	14
GLY	5.30	75.85/47.93	16	6
TRY	2.35	204.94/143.08	18	28
胞苷	5.34	243.98/111.92	14	10
尿苷	5.38	244.91/112.91	16	8
鸟苷	4.95	283.98/152.03	18	12
DNJ	9.90	163.95/82.58	30	20

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取 PHE、LYS、MET、LEU、THR、VAL、ILE、HIS、ALA、GLU、ARG、TYR、PRO、SER、ASN、ASP、GLY、TRY、胞苷、尿苷、鸟苷、DNJ 对照品适量, 加 10% 甲醇配制成浓度分别为 80.84, 81.20, 79.76, 70.00,

88.52, 80.72, 79.76, 83.36, 103.60, 92.16, 85.92, 108.08, 84.80, 85.56, 87.72, 94.20, 102.52, 78.76, 119.7, 122.5, 150.7, 88.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合对照品母液, 二倍法逐级稀释后经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。进样前, 选择稀释 2 倍及以上的混合对照品测定。

2.2.2 供试品溶液制备(初始条件) 精密称取各桑叶样品粉末 0.5 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 超纯水, 称重, 室温下超声(40 kHz, 80%功率)提取 50 min, 提取完毕后, 再次称重并补足失重。取上清液离心(14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 并用移液枪精密吸取 500 μL , 加入提取溶剂稀释一倍后, 移取 700 μL 与 300 μL 乙腈涡旋混合, 上述离心条件下离心, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 即得。

2.3 样品提取条件优化

为优选提取方法, 设计单因素实验, 考察提取溶剂种类、提取时间、超声功率及提取溶剂量对提出物质的影响^[9]。各因素水平设计如下, 提取溶剂: 水、10%甲醇、20%甲醇、30%甲醇; 提取功率: 40%, 60%, 80%, 100%; 提取溶剂量: 10, 15, 20, 25, 30 mL; 提取时间: 10, 20, 30, 40, 50, 60 min。初始提取条件如“2.2.2”项下所示, 当探究某一因素时, 其他因素保持不变。以 22 种物质的总量提取最多为筛选条件, 得出的最优提取方案: 提取溶剂为水、超声提取功率 100%、提取溶剂量为 25 mL、提取 30 min。考察结果见图 1。

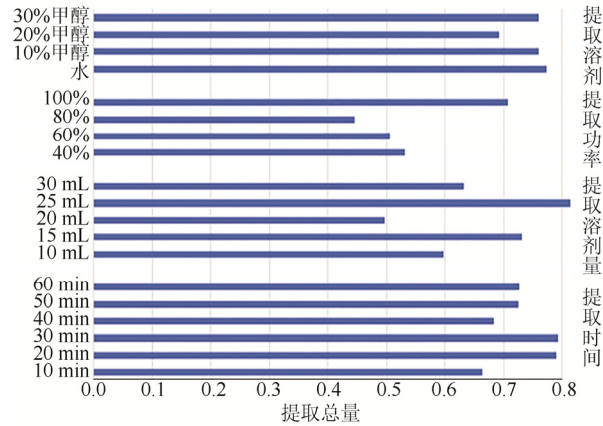


图 1 提取条件优化图

Fig. 1 Extract optimization diagram

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取“2.2.1”项下所制备的混合对照品溶液, 按“2.1.1”及“2.1.2”项下的液质方法测定, 以对照品峰面积(Y)对相应各物质的质量浓度(X)进行线性回归, 得各物质的回归方

程、相关系数及线性范围, 所得结果见表 2 及图 2, 结果表明该方法的线性良好。

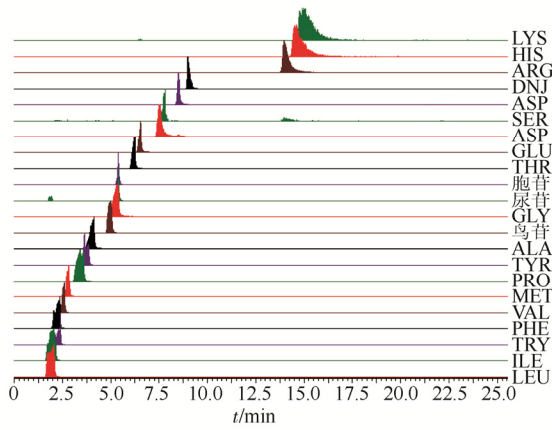


图 2 氨基酸、核苷及 DNJ MRM 图

Fig. 2 MRM diagram of amino acids, nucleosides and DNJ

2.4.2 仪器精密度考察 选稀释倍数为 3 倍的混合对照品溶液进样, 按“2.1.1”及“2.1.2”项下的液质方法测定, 连续进样 6 次, 并计算峰面积的 RSD 值, 所得结果见表 2, 结果表明该方法的仪器精密度良好。

2.4.3 重复性考察 取湖南省桑叶样品 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 按“2.3”项下优化好的条件制备供试品溶液, 并按照“2.1.1”及“2.1.2”项下的液质方法测定, 分别计算氨基酸、核苷及 DNJ 的质量分数和 RSD 值, 所得结果见表 2, 结果表明该方法的重复性良好。

2.4.4 稳定性考察 取湖南省桑叶样品 3 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 按“2.3”项下优化好的条件制备供试品溶液, 样品制备完成后, 按照“2.1.1”及“2.1.2”项下的液质方法于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 测定氨基酸、核苷及 DNJ 的峰面积, 计算峰面积的 RSD, 结果表明该方法稳定性良好, 结果见表 2。

2.4.5 加样回收率 取湖南省桑叶样品 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定。按 1:1 的加样率进行加样, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.1”及“2.1.2”项下的液质方法测定, 计算其加样回收率及 RSD 值, 计算结果见表 2, 结果表明该方法回收率良好。

2.5 各省份桑叶样品测定

按“2.3”项下条件制备 6 个省份的 18 个供试品溶液, 按“2.1.1”及“2.1.2”项下的液质方法测定, 根据相应线性方程计算供试品溶液中 22 种目标成分含量, 结果见表 3。

表2 氨基酸、核苷及DNJ方法学结果

Tab. 2 Results of methodological investigation on amino acids, nucleosides and DNJ

化合物	回归方程	r^2	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	精密密度 RSD/%	重复性 RSD/%	稳定性 RSD/%	加样回收率/%	回收率 RSD/%
PHE	$Y=18\,245X+1\,310.8$	0.997 8	0.039~20.210	0.8	7.4	0.9	92.8	8.2
LYS	$Y=12\,687X-1\,646.5$	0.997 6	0.040~20.300	2.4	1.4	2.2	93.6	4.6
MET	$Y=175\,631X+5\,147.2$	0.999 7	0.010~19.940	2.0	3.8	2.5	98.1	8.1
LEU	$Y=109\,335X+12\,299$	0.999 3	0.017~17.500	1.7	6.0	1.3	94.3	4.5
THR	$Y=33\,664X+4\,690.4$	0.999 5	0.086~23.130	2.7	3.3	3.1	98.0	8.2
VAL	$Y=276\,984X+44\,934$	0.993 7	0.020~20.180	1.3	2.1	1.5	95.5	5.6
ILE	$Y=68\,838X+28\,323$	0.990 3	0.039~19.940	3.3	4.0	3.2	88.7	5.2
HIS	$Y=13\,070X+974.5$	0.999 0	0.651~20.840	2.3	3.0	2.5	101.2	7.5
ALA	$Y=23\,990X+10\,492$	0.994 6	0.051~25.900	2.1	2.5	2.5	97.8	5.1
GLU	$Y=27\,843X+4\,244.2$	0.997 1	0.045~23.040	2.7	6.8	3.0	86.7	5.2
ARG	$Y=58\,683X+12\,166$	0.990 8	0.168~21.480	1.8	1.9	2.4	95.5	8.9
TYR	$Y=22\,162X+3\,169.3$	0.995 5	0.053~27.020	2.6	3.3	2.3	96.8	7.2
PRO	$Y=120\,403X+26\,532$	0.994 3	0.166~21.200	1.7	2.3	2.1	89.7	2.2
SER	$Y=311.23X+10.741$	0.998 8	0.334~21.390	4.8	4.9	3.6	100.1	6.1
ASN	$Y=15\,154X+1\,210.2$	0.999 8	0.343~21.930	3.5	4.2	3.5	95.6	2.3
ASP	$Y=19\,364X+47.3$	0.999 7	0.184~23.550	3.5	4.5	3.7	102.2	7.0
GLY	$Y=34\,113X+9\,459.6$	0.996 9	0.050~25.630	2.4	7.5	2.1	94.4	5.1
TRY	$Y=9\,739.4X+2\,475.6$	0.995 2	0.038~19.690	4.1	6.8	4.3	98.3	8.6
胞苷	$Y=41\,165X+1\,737$	0.998 6	0.015~14.936	2.2	1.7	1.5	97.0	8.0
尿苷	$Y=3\,353X+56.89$	1.000 0	0.239~15.313	2.7	4.6	3.0	99.6	5.5
鸟苷	$Y=58\,054X+9\,844.5$	0.994 8	0.074~18.838	4.1	6.7	4.6	94.8	7.2
DNJ	$Y=14\,264X+4\,528.2$	0.995 8	0.345~22.050	2.8	2.5	2.5	106.4	3.2

表3 样品含量测定结果

Tab. 3 Concentrations of different components in different samples

%

样品	GLY	ALA	SER	PRO	THR	ASN	ASP	LYS	GLU	HIS	DNJ
S1-1	0.004	0.092	0.011	0.017	0.016	0.025	0.019	0.035	0.035	0.003	0.065
S1-2	0.005	0.096	0.013	0.018	0.017	0.030	0.021	0.042	0.041	0.003	0.072
S1-3	0.004	0.091	0.011	0.017	0.016	0.027	0.020	0.038	0.036	0.003	0.070
S2-1	0.007	0.052	0.020	0.095	0.034	0.409	0.030	0.051	0.039	0.016	0.108
S2-2	0.007	0.049	0.018	0.098	0.036	0.467	0.033	0.056	0.041	0.016	0.115
S2-3	0.007	0.053	0.022	0.101	0.032	0.445	0.033	0.054	0.036	0.016	0.118
S3-1	0.007	0.110	0.060	0.030	0.031	0.543	0.106	0.084	0.071	0.019	0.394
S3-2	0.008	0.105	0.054	0.030	0.030	0.495	0.105	0.079	0.059	0.017	0.369
S3-3	0.008	0.110	0.061	0.030	0.031	0.483	0.097	0.074	0.060	0.019	0.381
S4-1	0.005	0.049	0.030	0.017	0.018	0.197	0.037	0.021	0.066	0.003	0.233
S4-2	0.005	0.049	0.025	0.018	0.017	0.196	0.038	0.020	0.062	0.002	0.225
S4-3	0.008	0.080	0.048	0.029	0.032	0.308	0.057	0.036	0.101	0.006	0.428
S5-1	0.008	0.096	0.040	0.066	0.042	0.404	0.061	0.058	0.131	0.016	0.127
S5-2	0.007	0.092	0.038	0.066	0.039	0.406	0.058	0.055	0.133	0.015	0.127
S5-3	0.007	0.096	0.036	0.066	0.041	0.394	0.058	0.052	0.124	0.016	0.123
S6-1	0.009	0.053	0.052	0.333	0.041	1.535	0.108	0.268	0.076	0.067	0.321
S6-2	0.006	0.040	0.033	0.271	0.027	1.105	0.079	0.176	0.060	0.044	0.208
S6-3	0.007	0.041	0.029	0.274	0.031	1.170	0.085	0.187	0.070	0.038	0.214
样品	TYR	鸟苷	LEU	VAL	ILE	MET	ARG	TRY	胞苷	尿苷	PHE
S1-1	0.018	0.044	0.020	0.017	0.020	0.002	0.017	0.001	0.009	0.014	0.008
S1-2	0.019	0.044	0.022	0.018	0.021	0.002	0.020	0.001	0.009	0.013	0.008
S1-3	0.016	0.038	0.021	0.018	0.020	0.002	0.021	0.001	0.008	0.012	0.008
S2-1	0.036	0.032	0.011	0.031	0.013	0.002	0.077	0.008	0.012	0.010	0.024
S2-2	0.034	0.030	0.010	0.031	0.012	0.001	0.080	0.008	0.012	0.010	0.023
S2-3	0.034	0.029	0.010	0.032	0.013	0.002	0.081	0.013	0.011	0.012	0.026
S3-1	0.027	0.116	0.024	0.045	0.032	0.001	0.114	0.006	0.035	0.022	0.025
S3-2	0.024	0.101	0.025	0.046	0.032	0.002	0.108	0.004	0.031	0.021	0.023
S3-3	0.028	0.109	0.026	0.048	0.033	0.002	0.117	0.005	0.032	0.027	0.027
S4-1	0.009	0.008	0.005	0.012	0.005	0.000	0.015	0.001	0.002	0.005	0.005
S4-2	0.007	0.009	0.005	0.013	0.004	0.000	0.013	0.001	0.002	0.006	0.005
S4-3	0.015	0.022	0.013	0.021	0.016	0.000	0.031	0.004	0.005	0.008	0.011
S5-1	0.032	0.054	0.014	0.045	0.020	0.002	0.046	0.010	0.013	0.012	0.029
S5-2	0.026	0.041	0.011	0.042	0.016	0.001	0.040	0.009	0.009	0.009	0.024
S5-3	0.029	0.046	0.014	0.043	0.020	0.001	0.040	0.009	0.010	0.010	0.027
S6-1	0.045	0.107	0.029	0.050	0.030	0.001	0.136	0.032	0.033	0.028	0.052
S6-2	0.028	0.052	0.019	0.045	0.021	0.001	0.084	0.020	0.014	0.017	0.036
S6-3	0.031	0.059	0.019	0.045	0.021	0.001	0.085	0.019	0.018	0.015	0.037

2.6 聚类分析

使用 SIMCA 14.1 软件对样品结果进行聚类分析, 结果见图 3。从图中可知, 同省份同一产地采集的 3 份样品较好地聚为一类, 若分成 3 类, 湖南产和南京产聚为一类、浙江产和天津产聚为一类、湖北产和江西产聚为一类, 若分为 2 类, 则湖南、南京、浙江及天津产可归为一类, 湖北及江西产可归为一类。

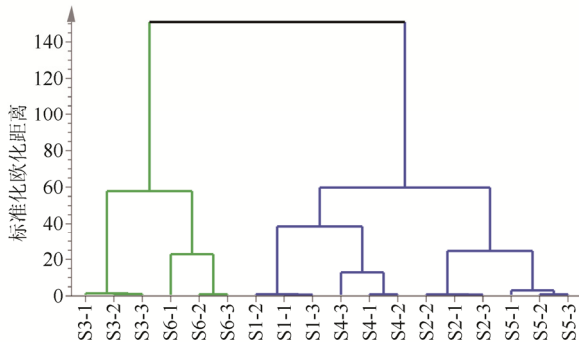


图 3 各地样品聚类分析树状图

S1-南京; S2-天津; S3-江西; S4-湖南; S5-浙江; S6-湖北。

Fig. 3 Cluster analysis of samples in different regions

S1-Nanjing; S2-Tianjin; S3-Jiangxi; S4-Hunan; S5-Zhejiang; S6-Hubei.

2.7 PCA 及偏最小二乘法判别(OPLS-DA)分析

2.7.1 PCA 分析 对各地样品测定结果进行 PCA 分析, 结合 PCA 得分图及载荷图得到 Biplot 图, 分析 Biplot 图可知湖南与南京样品距离较近、浙江与天津样品距离较近, 而江西与湖南、南京与湖北样品距离较远, 这与聚类分析结果一致。使用 DModX 对 PCA 检验, 结果无异常离群点, PCA 模型拟合优度 R^2X 达 0.992, 预测优度 Q^2 达 0.911, 提示此分析模型为一成功模型。对模型进一步分析可知, 江西产中 DNJ、LEU、ILE、鸟苷等成分

含量较高, 湖南与南京各综合含量不及江西及湖北, 南京产中 PHE、HIS、THR、LYS、ASN 等成分相对较低, 浙江和天津产各成分含量总体适中, 分析结果与表 3 中样品测定结果相符, 结果见图 4。

2.7.2 OPLS-DA 分析 Biplot 分析可知, 江西与湖南, 南京与湖北样品距离较远, 故选择江西与湖南, 南京与湖北做 OPLS-DA 分析。二者两两之间都能够较好地分开, 山西与湖南模型验证结果为 $R^2X=0.984$ 、 $R^2Y=0.997$ 、 $Q^2=0.994$, 南京与湖北模型验证结果为 $R^2X=0.986$ 、 $R^2Y=0.998$ 、 $Q^2=0.996$, 提示模型可靠。江西与湖南产中, VIP 值>1 的有 15 个成分, 结合载荷图, 可得有意义成分 15 个。南京与湖北产中, VIP 值>1 的有 14 个成分, 结合载荷图, 可得有意义成分 14 个。结果见图 5。

3 讨论

含量测定结果表明, 与降糖密切相关的生物碱 DNJ 在不同产地分布差异较大, 以江西产含量最高。聚类分析表明, 同一省份内桑叶品质相当; 根据成分含量差异, 6 个省份的桑叶可大致归为 2 组, 湖南、南京、浙江及天津为一组, 湖北及江西为一组。通过 PCA 分析选择差异性最大的 2 组(江西与湖南、南京与湖北)进行 OPLS-DA 分析, 发现 2 组都有十几个差异性成分, 二者共同的差异性成分有 8 个(ARG、HIS、VAL、PHE、LYS、ASP、ASN、ALA), 湖北与江西产区的 DNJ 及上述 8 种成分含量较高, 而湖南、南京、浙江及天津含量较低, 由此可以为区分二者来源做一些参考, 从 6 个产区共有的 8 个差异性成分及 DNJ 来分析, 湖北与江西的桑叶品质较优。

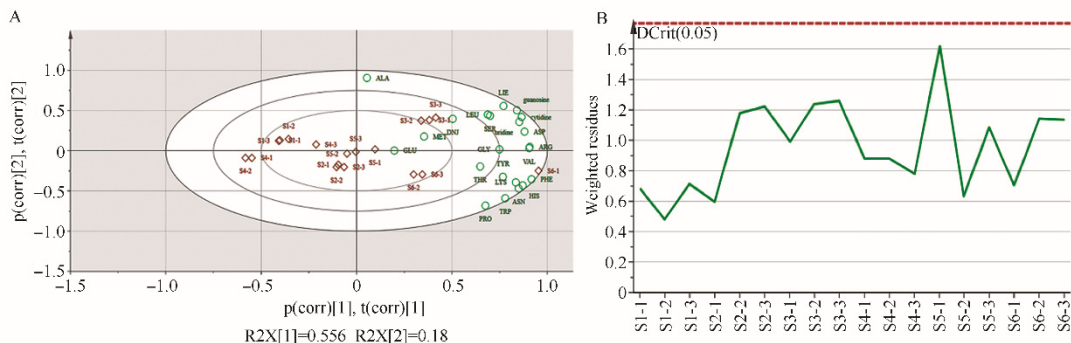


图 4 Biplot 及 DModX 图

A-Biplot 图; B-DModX 图; S1-南京; S2-天津; S3-江西; S4-湖南; S5-浙江; S6-湖北。

Fig. 4 Biplot and DModX diagram

A-Biplot; B-DModX; S1-Nanjing; S2-Tianjin; S3-Jiangxi; S4-Hunan; S5-Zhejiang; S6-Hubei.

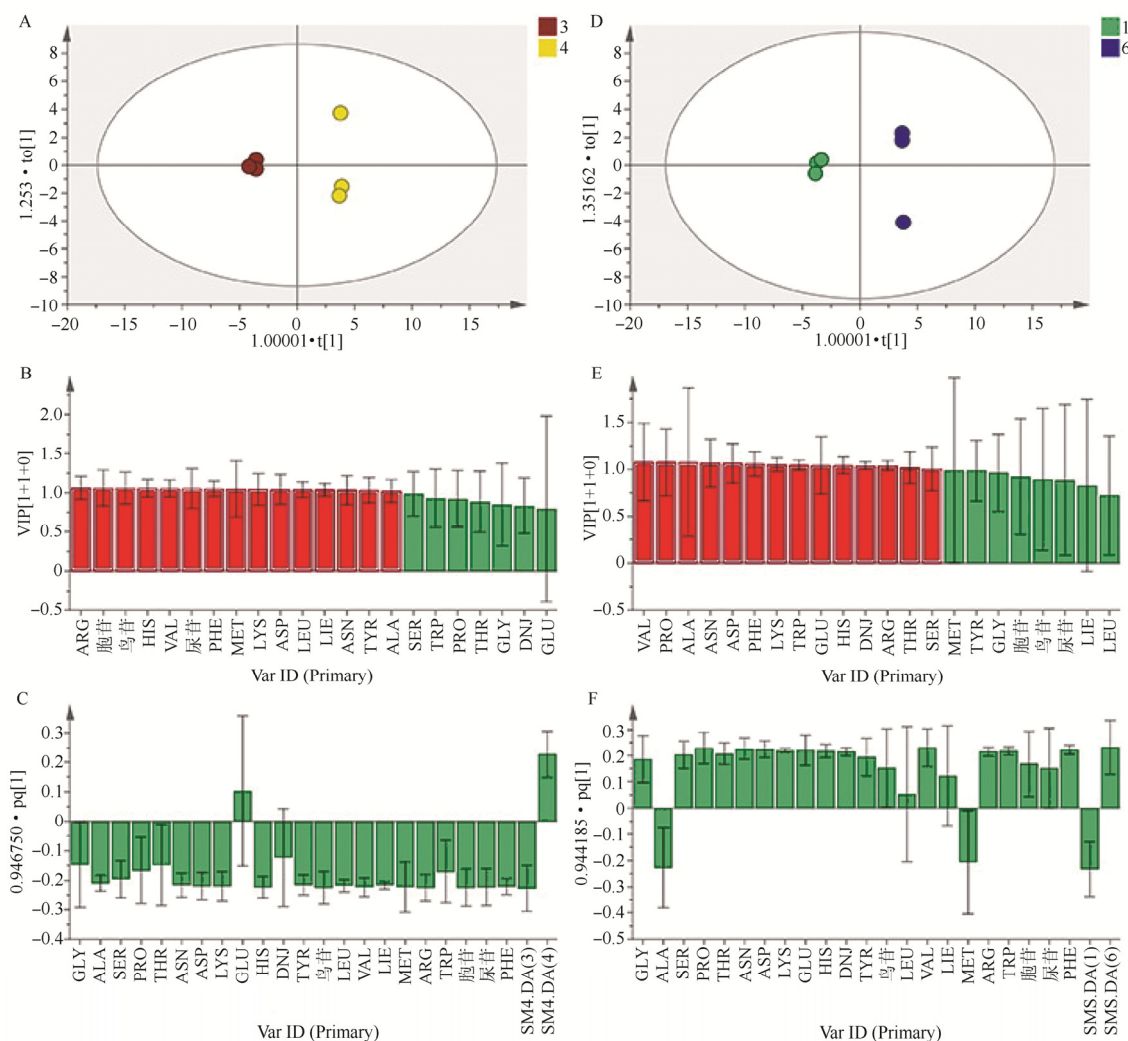


图 5 OPLS-DA 分析图

A-江西与湖南得分图; B-江西与湖南 VIP 图; C-江西与湖南载荷图; D-南京与湖北得分图; E-南京与湖北 VIP 图; F-南京与湖北载荷图; 1-南京; 3-江西; 4-湖南; 6-湖北。

Fig. 5 OPLS-DA analysis diagram

A-score plot(Jiangxi and Hunan); B-VIP diagram(Jiangxi and Hunan); C-loading plot(Jiangxi and Hunan); D-score plot(Nanjing and Hubei); E-VIP diagram(Nanjing and Hubei); F-loading plot(Nanjing and Hubei); 1-Nanjing; 3-Jiangxi; 4-Hunan; 6-Hubei.

REFERENCES

- [1] SUN L, MENG L, YAN C, et al. Active components of lowing blood glucose and their pharmacological effect of mulberry leaves [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(5): 471-473.
- [2] MU X Y, LI X J. Influence of Mori Folium total flavonoid on β -cells in rats with type-2 diabetic mellitus [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(11): 213-216.
- [3] JI T, SU S L, GUO S, et al. Research progress on bioactive component groups and their action mechanisms of Mori Folium for prevention and treatment of diabetes [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(5): 778-784.
- [4] 中国药典. 二部[S]. 2015: 297.
- [5] 徐琪寿. 氨基酸药理学研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(1): 30-32.
- [6] LEE J, CHUANG T H, REDECKE V, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(11): 6646-6651.
- [7] KINAHAN J J, KOWAL E P, GRINDEY G B. Biochemical and antitumor effects of the combination of thymidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine against leukemia L1210 [J]. Cancer Res, 1981, 41(2): 445-451.
- [8] ZHOU Y N, SUN H, BAI J, et al. Quality evaluation of Polygoni Multiflori Caulis by UHPLC specific chromatogram and multi-component quantitative analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(8): 1203-1207.
- [9] ZHANG L L, BAI Y L, SHU S L, et al. Simultaneous quantitation of nucleosides, nucleobases, amino acids, and alkaloids in mulberry leaf by ultra high performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2014, 37(11): 1265-1275.

收稿日期: 2019-05-07

(本文责编: 沈倩)