

## 基于 UPLC-MS/MS 法比较不同产地布渣叶中 19 个成分含量

何民友\*, 王利伟, 刘 林, 张珀瑜, 蓝金权, 万欣亚, 李振雨, 陈向东, 孙冬梅

(广东一方制药有限公司, 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244)

**摘要:** 基于 UPLC-MS/MS 法同时测定不同产地布渣叶中 19 个化合物的含量。以 50% 甲醇为提取溶剂, 采用 Agilent ZORBAX SB C18 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.1% 乙酸为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量为 2 μL; 采用电喷雾离子源, 在负离子模式下进行检测。结果表明, 建立的 UPLC-MS/MS 方法可较好地分离 19 个成分, 19 个成分的方法学考察结果良好。通过正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 可将 28 批不同产地布渣叶样品分为 3 类, 广东、广西、海南各自归为一类, 并筛选出影响不同产地质量差异的 10 个标志性化合物。本实验所建立的方法准确、可靠、灵敏度高、重复性好, 可为布渣叶质量标准的建立及后续深入完善其质量控制体系、临床安全用药等相关研究提供依据。

**关键词:** 布渣叶; UPLC-MS/MS; 含量测定; 统计学分析; 黄酮类; 酚酸类

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1374-08

## Determination of 19 components in *Microctis Folium* from different production areas based on UPLC-MS/MS

HE Min-you\*, WANG Li-wei, LIU Lin, ZHANG Po-yu, LAN Jin-quan, WAN Xin-ya, LI Zhen-yu, CHEN Xiang-dong, SUN Dong-mei

(Guangdong Yi Fang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan 528244, China)

**Abstract:** The paper is to establish an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 19 components in *Microctis Folium* from different production areas. The 50% methanol was used as extraction solvent. The Agilent ZORBAX SB C18 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column was used; mobile phase was acetonitrile - 0.1% acetic acid with gradient elution, flow rate was 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature was 30 °C, and the injection volume was 2 μL; electrospray ionization source was used and detected in negative ion mode. The results showed that the established UPLC-MS/MS method could well separate the 19 components, and the methodological investigation results of 19 components were good. By means of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), 28 batches of *Microctis Folium* samples from different production areas can be divided into three categories, Guangdong, Guangxi and Hainan are each classified into one category, and 10 signature compounds which affecting the quality differences of different production areas were screened out. The established method is accurate, reliable, sensitive and reproducible. It can provide a basis for the establishment of the quality standard of *Microctis Folium*, as well as for safety and quality research.

**Key words:** *Microctis Folium*; UPLC-MS/MS; content determination; statistical analysis; flavonoid; phenolic acid

收稿日期: 2023-12-05; 修回日期: 2024-01-30.

基金项目: 国家工信部 2022 年产业技术基础公共服务平台项目-中药全产业链质量技术服务平台 (2022-230-221); 2022 年佛山市南海区重点领域科技攻关专项.

\*通讯作者 E-mail: miyouyoo@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1365

布渣叶又名破布叶、麻布叶、蓑衣子等,为椴树科植物破布叶 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶<sup>[1,2]</sup>。布渣叶主要分布在我国岭南地区,为岭南特色药、食两用植物,是两广地区多种凉茶类保健食品的主要原料之一,在民间有“凉茶瑰宝”美誉<sup>[3,4]</sup>。布渣叶早载于清代何克谏所撰的岭南中草药专著《生草药性备要》:“味酸,性平,无毒,解一切蛊胀,清黄气,消热毒。作茶饮,去食积。”充分阐明了其具有消食化滞,清热利湿退黄等作用,可用于饮食积滞、感冒发热、湿热黄疸<sup>[5]</sup>。现代药理研究及临床应用表明,布渣叶具有调血脂、保护心血管、促进胃肠运动、退黄、镇痛、抗炎、抗氧化、抗衰老及杀虫等作用<sup>[6-8]</sup>。布渣叶化学成分主要有生物碱、黄酮类、三萜类、无机元素、甾体、有机酸、鞣质、酚类及糖类等成分<sup>[9-12]</sup>,其中黄酮类化合物为其主要活性成分,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保肝、抗衰老等作用<sup>[13]</sup>。另布渣叶也含有原花青素类成分,其具有较强的抗氧化、抗衰老等生理活性<sup>[14]</sup>。

药材的质量与其成分含量密切相关,不同产地的布渣叶因种质资源、生长条件及采收时间等因素影响,其成分含量存在较大的差异<sup>[15]</sup>。布渣叶含有的化学成分类型众多,但关于布渣叶的含量指标成分测定均为黄酮类化合物,且多集中于牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷等,目前尚未见酚酸类、原花青素类成分作为含量指标的研究,且含量测定研究多采用高效液相色谱法进行测定<sup>[6,7,14]</sup>。中药药理药效作用的发挥是多种有效成分之间相互协同,多靶点、多途径及整体性的作用,发挥对机体的调节作用<sup>[16]</sup>,因而布渣叶的其他类成分亦为其药效发挥作用的基础。由于不同化合物吸收光谱不一样,其最佳吸收波长不同,黄酮类化合物测定多选择320 nm,而酚酸类化合物多选择254 nm下测定,采用高效液相同时测定多成分含量灵敏度较低且存在局限性。超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱联用技术(UPLC-MS/MS)具有灵敏度高、分辨率高、准确度高、选择性强、分离性能好、专属检测能力强等特点,广泛应用于中药及其复方制剂复杂化学成分的定性研究、靶向定量分析、中药质量控制和药代动力学等方面的研究<sup>[17-19]</sup>。故本研究采用UPLC-MS/MS法测定布渣叶中19个成分的含量,包括黄酮类、酚酸类和原花青素类化合物,并结合化学计量学对不同产地布渣叶进行比较分析和综合评价,为布渣叶及其相关制剂全面质量控制提供参考。

## 材料与amp;方法

**仪器** Waters ACQUITY UPLC H-Class/Xevo TQD超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国 Waters

公司); Agilent ZORBAX SB C18 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱; XP26型百万分之一天平、ME204E型万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ 500 DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q-Direct型超纯水系统(德国默克股份有限公司)。

**样品与试剂** 咖啡酸(批号110885-201703,质量分数99.7%)、表儿茶素(批号110878-201703,质量分数99.7%)、阿魏酸(批号110773-201915,质量分数99.4%)、夏佛塔苷(批号111912-201703,质量分数95.6%)、牡荆苷(批号111687-202105,质量分数99.1%)、芦丁(批号10008-202012,质量分数91.6%)、异槲皮苷(批号11809-201804,质量分数97.2%)、水仙苷(批号111997-201501,质量分数93.1%)、椴树苷(批号112000-201802,质量分数98%)对照品购自中国食品药品检定研究院;原花青素B2(批号21032902,质量分数98.17%)、对羟基肉桂酸(批号21101401,质量分数99.94%)对照品购自成都普菲德生物技术有限公司;维采宁-2(批号DST210901-023,质量分数99.09%)、异夏佛塔苷(批号DSTDY001901,质量分数99.15%)、香蒲新苷(批号DST200207-024,质量分数99.21%)、异牡荆苷(批号DSTDY005401,质量分数98.75%)、异鼠李素-3-O-新橙皮苷(批号DSTDY007501,质量分数98.71%)、紫云英苷(批号DSTDZ000101,质量分数99.19%)、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(批号DST211203-083,质量分数99.46%)对照品购自乐美天医药科技有限公司,山柰酚-3-O-芸香糖苷(批号CFS202102,质量分数98%)对照品购自Chem Faces公司。乙腈为色谱纯(德国默克股份有限公司);乙酸为色谱纯(天津科密欧化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯;超纯水由Milli-Q-Direct型超纯水系统制备。实验用布渣叶样品为实地考察收集,经广州中医药大学黄海波教授鉴定均为椴树科植物破布叶 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶,并经广东一方制药有限公司质量中心检测均符合药典规定,样品产地信息详见表1。

**色谱条件** 采用 Agilent ZORBAX SB C18 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱;流动相为乙腈(A)-0.1%乙酸溶液(B),梯度洗脱(0~33 min, 91%~83% B; 33~37 min, 83%~75% B; 37~45 min, 75%~72% B; 45~65 min, 72%~20% B),流速为0.3 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为30 °C,进样体积为2 μL。

**质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI);选择负离子模式(ESI<sup>-</sup>);毛细管电压为3.10 kV;离子源温度为150 °C;锥孔气体积流量为55 L·h<sup>-1</sup>;碰撞气流量为2.5 L·h<sup>-1</sup>;脱溶剂气温度为500 °C;脱溶剂气流为900 L·h<sup>-1</sup>。质谱

**Table 1** Origin information of *Microctis Folium* samples

Sample No.	Origin	Sample No.	Origin
BZY01	Xiashan-1, Zhanjiang, Guangdong	BZY15	Tanshui-1, Yangchun, Guangdong
BZY02	Xiashan-2, Zhanjiang, Guangdong	BZY16	Tanshui-2, Yangchun, Guangdong
BZY03	Xiashan-3, Zhanjiang, Guangdong	BZY17	Tanshui-3, Yangchun, Guangdong
BZY04	Suixi-1, Zhanjiang, Guangdong	BZY18	Bajia-1, Yangchun, Guangdong
BZY05	Suixi-2, Zhanjiang, Guangdong	BZY19	Bajia-2, Yangchun, Guangdong
BZY06	Suixi-3, Zhanjiang, Guangdong	BZY20	Yulin-1, Guangxi
BZY07	Xingning-1, Meizhou, Guangdong	BZY21	Yulin-2, Guangxi
BZY08	Xingning-2, Meizhou, Guangdong	BZY22	Yulin-3, Guangxi
BZY09	Xingning-3, Meizhou, Guangdong	BZY23	Qinzhou-1, Guangxi
BZY10	Yangxi-1, Yangjiang, Guangdong	BZY24	Qinzhou-2, Guangxi
BZY11	Yangxi-2, Yangjiang, Guangdong	BZY25	Qinzhou-3, Guangxi
BZY12	Yangxi-3, Yangjiang, Guangdong	BZY26	Wuzhishan-1, Hainan
BZY13	Yangxi-4, Yangjiang, Guangdong	BZY27	Wuzhishan-2, Hainan
BZY14	Yangxi-5, Yangjiang, Guangdong	BZY28	Wuzhishan-3, Hainan

扫描采用多重反应检测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描模式。Cone 参数和 Collision 质谱参数优化通过蠕动针泵注射的方法调谐各标准化合物。19 个成分的质谱参数见表 2。

**对照品溶液的配制** 分别取咖啡酸、原花青素 B2、表儿茶素、对羟基肉桂酸、阿魏酸、夏佛塔昔、牡荆昔、水仙昔和椴树昔对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成浓度分别为 10.32、10.20、99.80、10.13、10.14、10.26、25.01、10.03、9.99  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液 A; 再分别取维采宁-2、异夏佛塔昔、香蒲新昔、异牡荆昔、芦丁、异槲皮昔、异鼠李素-3-*O*-新橙皮昔、山柰酚-3-*O*-芸香糖昔、紫云英昔和异鼠李素-3-*O*-葡萄糖昔对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成浓度分别为 10.27、25.19、10.05、25.13、10.10、10.49、10.44、25.12、10.25、25.31  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液 B。

**供试品溶液的制备** 精密称取布渣叶样品粉末 (过三号筛) 0.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 30 min, 取出, 放冷, 用 50% 甲醇补足减失重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

**专属性考察** 分别精密吸取混合对照品溶液 (A、B)、布渣叶供试品溶液和空白溶液, 按上述色谱条件和质谱条件测定, 比较空白溶液、混合对照品溶液和供试品溶液的色谱图。

**线性关系考察与定量限** 分别精密吸取混合对照品溶液储备溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 连同储备溶液按上述色谱条件和质谱条件进样测定。另取混合对照品溶液逐级稀释, 以信噪比为 10 的浓度为最低定量限 (LOQ), 以信噪比为 3 的浓度为最低检测限 (LOD)。

**Table 2** UPLC-MS/MS parameters of each component. DP: Declustering potential; CE: Collision energy. "\*" is quantitative ion

No.	Compound	$t_{\text{R}}$ /min	Parent ion ( $m/z$ )	Daughter ion ( $m/z$ )	DP/V	CE/V
1	Caffeic acid	7.48	179.03	135.04* 134.04	30	13
2	Procyanidin B2	8.55	577.14	289.07* 125.02	48	45
3	Epicatechin	10.15	289.07	245.08* 109.03	50	15
4	Vicenin-2	12.80	593.15	353.07* 383.08	75	37
5	4-Hydroxycinnamic acid	13.19	163.04	119.05* 120.05	30	13
6	Ferulic acid	17.23	193.05	134.04* 137.02	30	15
7	Schaftoside	18.49	563.14	353.07* 383.08	70	40
8	Isoschaftoside	22.82	563.14	353.07* 383.08	70	40
9	Vitexin	23.17	431.10	311.06* 283.06	45	22
10	Typhaneoside	24.26	769.22	314.04* 299.02	85	45
11	Isovitexin	24.45	431.10	311.06* 341.07	45	20
12	Rutin	25.03	609.15	300.03* 271.02	75	42
13	Isoquercitrin	26.06	463.09	300.03* 271.02	55	30
14	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -nehesperidine	27.55	623.16	314.04* 271.02	75	35
15	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	32.12	593.15	284.03* 285.04	60	38
16	Astragaln	33.18	447.09	284.03* 255.03	50	28
17	Narcissoside	34.12	623.16	315.05* 299.02	65	30
18	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	35.37	477.10	314.04* 243.03	60	30
19	Tiliroside	43.72	593.13	284.03* 255.03	60	35

**仪器精密度** 分别精密吸取混合对照品溶液A、B, 按上述色谱条件和质谱条件连续进样6次, 测定并记录峰面积, 计算19个化合物峰面积的RSD值。

**重复性** 精密称取布渣叶样品(BZY01)粉末(过三号筛)0.5 g, 平行6份, 按上述“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件和质谱条件进样测定, 计算19个化合物含量及RSD值。

**加样回收率** 精密称取同一批次已知含量的布渣叶样品(BZY01)粉末(过三号筛)0.25 g, 平行6份, 分别加入与样品中各成分含量相近的混合对照品溶液, 按上述“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件和质谱条件进样测定, 计算加样回收率及RSD值。

**稳定性** 取同一份布渣叶样品(BZY01)供试品溶液, 按上述色谱条件和质谱条件分别在0、2、4、8、12、18、24 h进样测定, 记录19个化合物峰面积并计算其RSD值。

**样品含量测定** 取布渣叶样品(BZY01~BZY28)粉末(过三号筛)0.5 g, 按上述“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件和质谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品的含量。

**OPLS-DA分析** 为明确引起不同产地间质量差异的特征性成分, 以各化合物含量测定结果为变量采用Simca 14.1软件进行正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA), 建立OPLS-DA模型, 并进一步生成OPLS-DA得分图。

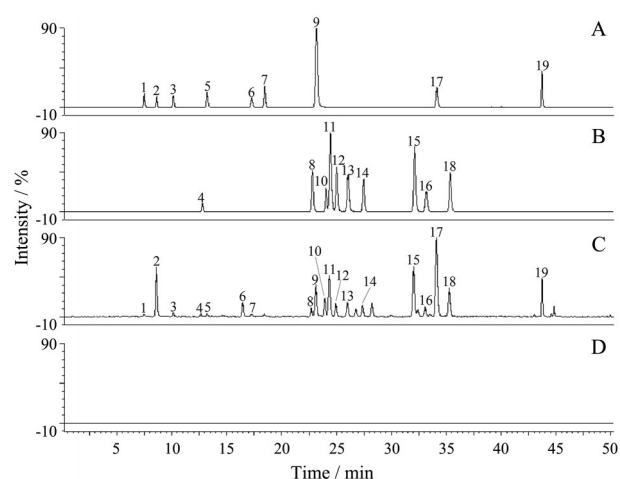
## 结果

### 1 方法学考察

**1.1 专属性考察** 混合对照品溶液(A、B)、布渣叶供试品溶液和空白溶液的总离子流图见图1。供试品溶液中各成分间分离效果良好, 且保留时间与混合对照品基本一致, 各化合物之间无干扰, 表明该方法专属性良好。

**1.2 仪器精密度** 咖啡酸、原花青素B2、表儿茶素、维采宁-2、对羟基肉桂酸、阿魏酸、夏佛塔昔、异夏佛塔昔、牡荆昔、香蒲新昔、异牡荆昔、芦丁、异槲皮昔、异鼠李素-3-O-新橙皮昔、山柰酚-3-O-芸香糖昔、紫云英昔、水仙昔、异鼠李素-3-O-葡萄糖昔、椴树昔的峰面积RSD值分别为0.98%、0.27%、1.12%、1.36%、0.87%、0.65%、1.06%、1.60%、0.54%、0.47%、1.02%、1.69%、0.84%、0.36%、2.29%、0.55%、1.41%、2.08%、0.28%, 结果表明, 仪器精密度良好。

**1.3 线性关系考察与定量限** 以对照品质量浓度为横坐标( $X, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 峰面积为纵坐标( $Y$ )绘制标准曲



**Figure 1** TIC chromatograms of mixed standard solutions (A, B), Microctis Folium sample solution (C), and blank solution (D). 1: Caffeic acid; 2: Procyanidin B2; 3: Epicatechin; 4: Vicenin-2; 5: 4-Hydroxycinnamic acid; 6: Ferulic acid; 7: Schaftoside; 8: Isoschafutaside; 9: Vvitexin; 10: Yphanesoid; 11: Isovitexin; 12: Rutin; 13: Isoquercitrin; 14: Isorhamnetin-3-O-nehesperidine; 15: Kaempferol-3-O-rutinoside; 16: Astragalgin; 17: Narcissoside; 18: Isorhamnetin-3-O-glucoside; 19: Tiliroside

线, 计算各成分的线性回归方程和相关系数, 19个成分在各自检测范围内相关系数均大于0.995, 结表明线性关系良好。回归方程、线性范围、检测限、定量限结果见表3。

**1.4 重复性** 咖啡酸、原花青素B2、表儿茶素、维采宁-2、对羟基肉桂酸、阿魏酸、夏佛塔昔、异夏佛塔昔、牡荆昔、香蒲新昔、异牡荆昔、芦丁、异槲皮昔、异鼠李素-3-O-新橙皮昔、山柰酚-3-O-芸香糖昔、紫云英昔、水仙昔、异鼠李素-3-O-葡萄糖昔和椴树昔含量RSD分别为0.32%、0.67%、1.25%、2.16%、0.47%、1.86%、0.54%、2.09%、1.36%、2.11%、0.49%、0.58%、2.35%、1.42%、0.58%、1.60%、0.83%、0.97%、0.71%, 结果表明该方法重复性良好。

**1.5 加样回收率** 咖啡酸、原花青素B2、表儿茶素、维采宁-2、对羟基肉桂酸、阿魏酸、夏佛塔昔、异夏佛塔昔、牡荆昔、香蒲新昔、异牡荆昔、芦丁、异槲皮昔、异鼠李素-3-O-新橙皮昔、山柰酚-3-O-芸香糖昔、紫云英昔、水仙昔、异鼠李素-3-O-葡萄糖昔和椴树昔的平均回收率分别为98.25%、100.36%、101.25%、96.27%、98.10%、99.05%、100.87%、99.06%、98.11%、95.43%、97.62%、97.89%、98.53%、96.71%、103.08%、100.25%、98.09%、98.47%、99.52%, RSD值分别为2.32%、1.97%、3.05%、3.27%、2.66%、1.84%、2.73%、3.56%、4.02%、3.91%、2.07%、1.88%、4.16%、3.18%、4.05%、2.48%、3.36%、4.52%、1.56%。结果显示19个化合物加样回收率为

**Table 3** Regression equations, linear range, limit of quantitation (LOQ) and limit of detection (LOD) of 19 compounds

Compound	Regression equation	<i>r</i>	Linear range/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
Caffeic acid	$Y = 1\ 367.23X - 20.78$	0.999 6	0.206-10.319	0.103 2	0.020 6
Procyanidin B2	$Y = 186.78X + 91.87$	0.999 8	2.448-61.199	0.153 0	0.045 9
Epicatechin	$Y = 48.19X + 209.14$	0.996 4	3.992-199.599	0.099 8	0.033 3
Vicenin-2	$Y = 2\ 028.64X + 229.59$	0.998 8	0.205-5.135	0.102 7	0.020 5
4-Hydroxycinnamic acid	$Y = 545.45X - 86.56$	0.995 9	0.203-5.064	0.101 3	0.033 8
Ferulic acid	$Y = 879.31X - 124.26$	0.998 2	0.203-10.144	0.020 3	0.006 8
Schaftoside	$Y = 1\ 545.59X + 120.54$	0.999 6	0.205-10.263	0.102 6	0.034 2
Isoschaftoside	$Y = 1\ 291.65X + 737.45$	0.999 2	0.504-25.194	0.050 4	0.001 7
Vitexin	$Y = 1\ 992.41X + 7\ 606.01$	0.995 3	1.500-75.024	0.075 0	0.015 0
Typhaneoside	$Y = 3\ 480.32X + 651.14$	0.999 4	0.603-30.150	0.120 6	0.040 2
Isovitexin	$Y = 1\ 897.28X + 2\ 663.83$	0.997 5	1.005-50.254	0.100 5	0.033 5
Rutin	$Y = 4\ 168.39X + 962.02$	0.999 8	0.404-20.207	0.010 1	0.003 4
Isoquercitrin	$Y = 2\ 534.90X + 302.36$	0.999 7	0.420-20.976	0.042 0	0.014 0
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -nehesperidine	$Y = 3\ 654.74X + 1\ 196.79$	0.999 6	0.418-20.877	0.083 5	0.027 8
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	$Y = 2\ 827.71X + 1\ 661.22$	0.999 3	1.005-50.235	0.100 5	0.020 1
Astragalin	$Y = 2\ 861.84X + 87.66$	0.999 4	0.205-10.251	0.102 5	0.034 2
Narcissoside	$Y = 2\ 155.58X + 7\ 581.83$	0.997 6	2.006-100.315	0.200 6	0.066 9
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	$Y = 2\ 591.73X + 2\ 721.20$	0.997 4	1.013-50.625	0.101 3	0.033 8
Tiliroside	$Y = 3\ 904.58X + 3\ 818.86$	0.996 9	0.399-19.972	0.039 9	0.012 0

95.43%~103.08%, RSD 值 $\leq$ 5%, 表明该方法准确度良好。

**1.6 稳定性** 咖啡酸、原花青素 B2、表儿茶素、维采宁-2、对羟基肉桂酸、阿魏酸、夏佛塔昔、异夏佛塔昔、牡荆昔、香蒲新昔、异牡荆昔、芦丁、异槲皮昔、异鼠李素-3-*O*-新橙皮昔、山柰酚-3-*O*-芸香糖昔、紫云英昔、水仙昔、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖昔和椴树昔的峰面积 RSD 值分别为 0.25%、0.36%、1.08%、0.76%、1.35%、2.07%、1.13%、0.68%、1.39%、1.08%、1.57%、2.34%、2.31%、0.87%、0.92%、0.89%、1.43%、1.68%、1.80%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

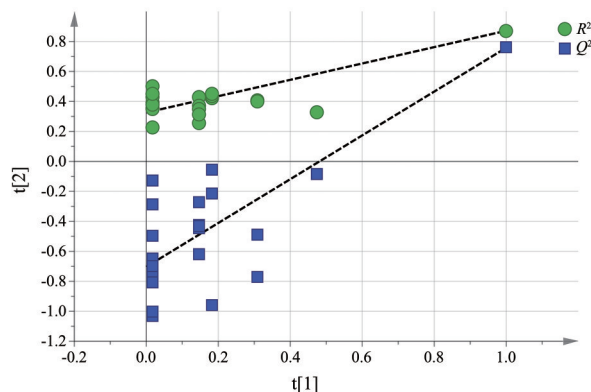
## 2 样品含量测定

28 批布渣叶中 19 个化合物的含量测定结果见表 4。结果显示，19 个化合物在布渣叶中存在一定差异，其中原花青素 B2、表儿茶素和水仙昔的平均含量较高，咖啡酸的平均含量最低；且各批次间 19 个化合物间含量差异明显。

## 3 统计学分析

OPLS-DA 模型共筛选 5 个主成分，其  $R^2Y$  为 0.866 和  $Q^2$  为 0.680，说明该模型稳定性和预测能力均较好。经过 200 次置换检验， $R^2$  与  $Y$  轴正半轴的截距为 0.295 ( $< 0.4$ ) 和  $Q^2$  与  $Y$  轴负半轴的截距为 -0.765 ( $< -0.05$ )，证明建立的模型稳定有效，可进一步应用于布渣叶质量稳定性差异标志物的筛选 (图 2)<sup>[20]</sup>。进一步生成 OPLS-DA 得分图 (图 3)，28 批布渣叶样品分为 3 类，来着广东产地样品 (BZY01~BZY19) 归为 I 类，广西产地样品 (BZY20~BZY25) 归为 II 类，海南产地样品

(BZY26~BZY28) 归为 III 类，3 组样品聚类良好，样品集中度较高，通过 OPLS-DA 得分图可将来自不同产地样品进行分类。变量重要性投影值 (VIP) 是 OPLS-DA 模型筛选潜在差异标志物最重要的分析，成分指标 VIP 值越大，表示其对于解释变量的贡献越大和差异相关性越高<sup>[21]</sup>。以 VIP 值  $> 1.0$  为变量差异性筛选标准，共筛选得到 10 个质量差异标志物的化合物 (图 4)，按 VIP 大小顺序依次为紫云英昔  $>$  原花青素 B2  $>$  表儿茶素  $>$  异鼠李素-3-*O*-新橙皮昔  $>$  芦丁  $>$  异槲皮昔  $>$  夏佛塔昔  $>$  对羟基肉桂酸  $>$  水仙昔  $>$  山柰酚-3-*O*-芸香糖昔，这些化合物除黄酮类化合物外，还含有多酚类化合物，表明多酚类化合物亦为布渣叶不同产地质量稳定性差异的主要影响因素；因此，对布渣叶药材研究除关注黄酮类成分外，还需要关注多酚类成分对其质量的影响。



**Figure 2** Orthogonal partial least squares discriminant analysis model permutation test diagram

Table 4 Results of content determination of 19 compounds (mg·g<sup>-1</sup>)

Sample No.	Caffeic acid	Procyanidin B2	Epicatechin	Vicenin-2	4-Hydroxycinnamic acid	Ferulic acid	Schaftoside	Isoschaftoside	Vitexin	Typhaneoside	Isovitexin	Rutin	Isoquercitrin	Isorhamnetin-3-O-mehesperidine rutoside	Kaempferol-3-O-astragalol rutoside	Narcissoside	Isorhamnetin-3-O-glucoside	Tiliroside	
BZY01	0.07	2.56	1.65	0.15	0.09	0.13	0.07	0.21	0.42	0.41	0.60	0.14	0.15	0.18	0.92	0.19	2.06	0.88	0.54
BZY02	0.09	2.57	1.67	0.33	0.06	0.19	0.08	0.43	0.30	0.00	0.56	0.25	0.14	0.00	1.19	0.15	2.86	0.66	0.23
BZY03	0.04	2.25	2.18	0.19	0.16	0.13	0.09	0.28	0.57	0.30	0.77	0.13	0.10	0.10	1.00	0.20	1.66	0.72	0.87
BZY04	0.03	2.68	1.90	0.22	0.12	0.12	0.11	0.31	0.86	0.35	1.26	0.26	0.20	0.16	1.09	0.20	2.46	0.98	0.82
BZY05	0.04	2.50	1.65	0.27	0.12	0.13	0.11	0.36	0.71	0.31	1.02	0.28	0.17	0.10	1.26	0.20	2.79	1.05	0.77
BZY06	0.04	2.07	1.31	0.27	0.10	0.11	0.11	0.36	0.94	0.23	1.28	0.26	0.16	0.05	1.16	0.17	2.78	0.92	0.66
BZY07	0.04	1.49	0.74	0.21	0.04	0.10	0.08	0.28	0.54	0.27	0.72	0.25	0.23	0.11	0.88	0.18	2.23	0.97	0.40
BZY08	0.05	2.16	2.38	0.18	0.18	0.15	0.09	0.23	0.90	0.42	1.19	0.16	0.14	0.11	0.87	0.22	1.63	0.78	0.86
BZY09	0.05	1.81	0.91	0.18	0.04	0.11	0.07	0.23	0.51	0.37	0.71	0.26	0.24	0.11	0.80	0.17	2.06	0.86	0.31
BZY10	0.01	0.26	0.09	0.18	0.05	0.05	0.09	0.28	0.62	0.12	0.65	0.13	0.11	0.04	0.71	0.12	1.54	0.51	0.23
BZY11	0.01	0.42	0.17	0.26	0.10	0.07	0.11	0.39	0.44	0.12	0.50	0.08	0.05	0.04	0.75	0.12	1.84	0.59	0.27
BZY12	0.01	0.76	0.20	0.29	0.11	0.07	0.11	0.43	0.76	0.15	0.91	0.13	0.08	0.03	0.83	0.14	2.10	0.73	0.48
BZY13	0.05	0.90	0.36	0.12	0.13	0.12	0.10	0.16	0.97	0.20	1.18	0.13	0.11	0.09	0.72	0.14	2.08	0.75	0.41
BZY14	0.03	1.06	0.37	0.34	0.14	0.12	0.14	0.48	0.65	0.23	0.86	0.22	0.20	0.13	1.06	0.20	2.74	1.11	0.39
BZY15	0.04	1.61	0.74	0.18	0.03	0.11	0.09	0.25	0.37	0.13	0.61	0.40	0.44	0.04	0.92	0.16	2.77	1.19	0.20
BZY16	0.06	2.46	1.39	0.15	0.04	0.11	0.08	0.21	0.56	0.15	0.87	0.40	0.44	0.05	0.89	0.14	2.40	0.94	0.22
BZY17	0.09	1.96	1.58	0.12	0.06	0.14	0.05	0.17	0.26	0.01	0.40	0.26	0.31	0.01	0.84	0.12	1.95	0.82	0.12
BZY18	0.07	2.98	2.04	0.18	0.04	0.14	0.11	0.24	0.56	0.19	0.91	0.46	0.45	0.04	1.00	0.16	2.64	0.95	0.23
BZY19	0.07	2.02	1.19	0.14	0.04	0.13	0.06	0.19	0.47	0.18	0.76	0.31	0.32	0.06	0.91	0.15	2.33	0.88	0.20
BZY20	0.06	3.77	4.03	0.20	0.05	0.12	0.05	0.25	0.31	0.79	0.56	0.19	0.07	0.18	0.70	0.09	1.44	0.45	0.11
BZY21	0.05	3.53	3.69	0.18	0.05	0.10	0.05	0.23	1.62	0.79	0.53	0.17	0.07	0.14	0.67	0.09	1.34	0.42	0.14
BZY22	0.04	3.83	3.54	0.14	0.03	0.12	0.06	0.20	0.49	0.00	0.73	0.18	0.08	0.00	0.96	0.12	2.05	0.50	0.13
BZY23	0.06	3.17	3.03	0.27	0.05	0.11	0.09	0.33	0.69	0.41	1.02	0.26	0.21	0.13	1.08	0.18	2.55	0.97	0.39
BZY24	0.03	3.80	1.96	0.17	0.02	0.03	0.03	0.16	0.17	0.30	0.31	0.39	0.27	0.04	0.94	0.07	2.75	0.57	0.10
BZY25	0.02	3.89	2.32	0.16	0.02	0.02	0.05	0.20	0.39	0.04	0.60	0.16	0.15	0.01	0.73	0.07	1.92	0.50	0.11
BZY26	0.02	5.23	7.64	0.26	0.00	0.03	0.08	0.34	0.34	0.07	0.57	0.47	0.38	0.06	1.41	0.26	2.48	0.96	0.43
BZY27	0.10	4.55	7.80	0.24	0.04	0.14	0.12	0.63	1.00	0.31	1.15	0.64	0.56	0.05	1.47	0.27	3.71	2.37	0.36
BZY28	0.08	4.23	5.83	0.16	0.02	0.08	0.08	0.24	0.73	0.35	1.11	0.81	0.88	0.03	1.14	0.24	3.60	1.90	0.17
Aveg.	0.05	2.52	2.23	0.21	0.07	0.11	0.08	0.29	0.61	0.26	0.80	0.28	0.24	0.07	0.96	0.16	2.31	0.89	0.36

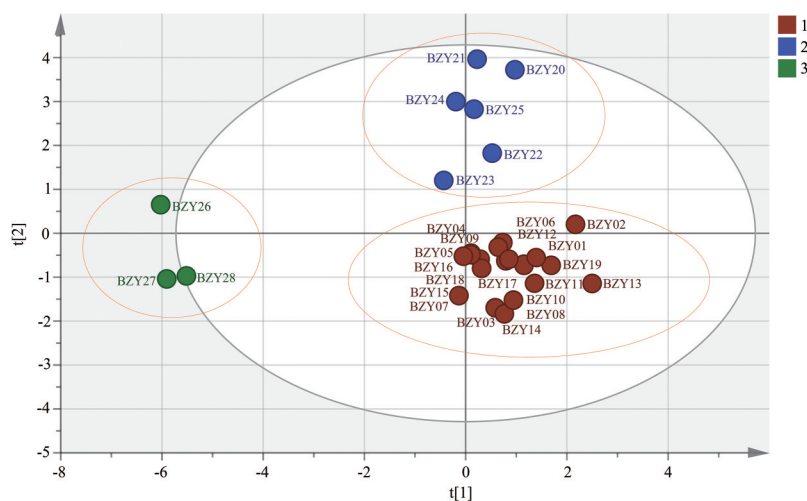


Figure 3 Orthogonal partial least squares discriminant analysis scores diagram

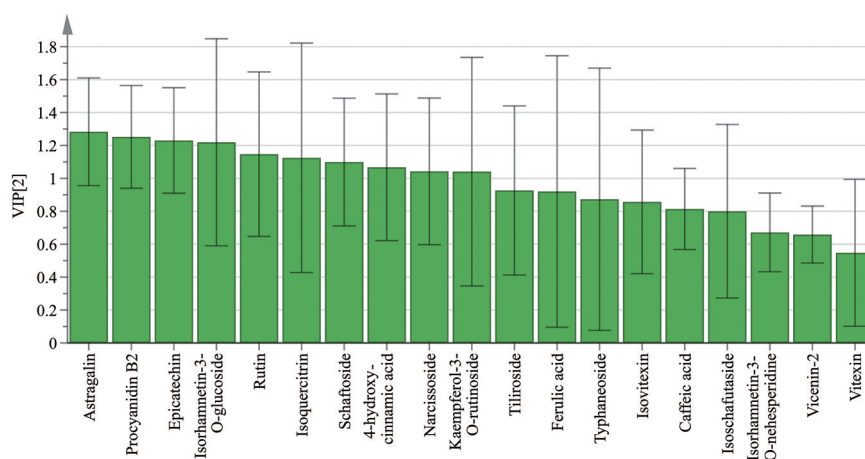


Figure 4 VIP diagram of orthogonal partial least squares discriminant analysis

## 讨论

在实验过程中对色谱条件和质谱条件进行了优化,考察了不同流动相体系(乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%乙酸溶液、乙腈-0.05%乙酸溶液、乙腈-0.2%乙酸溶液、甲醇-0.1%乙酸溶液)、不同品牌色谱柱(Waters Cortecs T3、Waters BEH C18、Agilent ZORBAX SB C18)、不同柱温(25、30、35 °C)等对色谱峰峰形及其响应值的影响。结果显示,以乙腈-0.1%乙酸溶液为流动相,柱温为30 °C,选择Agilent ZORBAX SB C18(150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱时,所得色谱峰的峰型较好,且响应值强度较高。同时,对离子化模式进行确认,在负离子模式下各化合物响应值较高。本研究还根据不同碰撞能量对19个化合物母离子进行撞击以确定最佳碰撞能量,并选择响应强度最高的离子对作为定量离子对,并通过电压优化确定了最终的碰撞能量。

本研究前期对布渣叶提取溶剂(乙醇、70%乙醇、

50%乙醇、甲醇、70%甲醇、50%甲醇)、提取方式(超声处理、加热回流)、提取时间(15、30、60 min)及提取溶剂用量(25、50、100 mL)进行了单因素考察,以各化合物响应值为评价指标,最终确定提取最优条件为取0.5 g布渣叶粉末,加50%甲醇25 mL,加热回流30 min。

本研究采用UPLC-MS/MS法对不同产地的布渣叶中19个化合物含量进行比较,并结合化学计量学分析方法探究不同产地布渣叶的质量差异。实验结果表明,不同产地的布渣叶中各成分含量存在一定差异,这种差异具有统计学上的显著性,且通过OPLS-DA可将不同产地布渣叶进行区分。文献<sup>[14]</sup>研究表明,黄酮类是布渣叶的主要物质成分和药理药效成分,具有抗动脉硬化、抗肿瘤、抗衰老、保护心血管等作用。中药化学成分复杂多样,是通过多成分间相互作用、协同以发挥其临床药效,单一类成分难以准确表达其功效。本研究VIP值结果显示,VIP值大于1.0共筛选得到10个标志性化合物,该10种化合物为影响不同产地差异的主要因素,在建立布渣叶及其制剂质量标准应充分考虑这

些成分作为含量指标, 该 10 种化合物除包含黄酮类成分外, 还包含多酚类化合物 (对羟基肉桂酸、原花青素 B2), 其中原花青素 B2 在布渣叶样品中平均含量最高; 因此, 在布渣叶质量评价中, 应全面考虑各成分对其质量的影响, 为布渣叶质量标准的建立提供科学依据。

综上所述, 本研究收集了不同产地 28 批布渣叶, 构建了 UPLC-MS/MS 法测定样品中各活性成分的含量, 并以 19 个化合物含量为指标, 采用统计学分析比较不同产地间差异, 并找到影响产地质量差异的标志化合物, 可为后续深入完善其质量控制体系、临床安全用药等相关研究提供依据。

**作者贡献:** 何民友负责方法建立、实验数据处理、撰写文章及编辑部修改意见核修等; 王利伟和刘林负责实验材料收集; 张珀瑜、蓝金权和万欣亚负责实验研究; 李振雨和陈向东负责实验的设计、课题的指导和论文框架的构建; 孙冬梅负责实验的整体设计把关和文章审阅, 并最终定稿。

**利益冲突:** 无任何利益冲突。

## References

- [1] Hu K, Li J, Tu PF. Study on chemical constituents of *Microctis Folium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43: 844-846.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 99.
- [3] Lu XH. "Herbal tea gem" of *Microctis Folium* [J]. *For Guangxi* (广西林业), 2016, 6: 22-23.
- [4] Sun DM, Wang MX. Advances on chemical constituents and pharmacological effects of *Microcos paniculata* [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2015, 10: 143-147.
- [5] He KJ (Qing). Preparation of Raw Herbs (Three ancient books of Lingnan Materia Medica) [生草药性备要 (岭南本草古籍三种)] [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1999: 32.
- [6] Liu CL, Lin S, He ZR, et al. Simultaneous determination of eight flavone glycosides in total flavonoids fraction of *Microcos paniculata* using quantitative analysis of multi-components by single marker method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48: 1872-1877.
- [7] Jiang JY, Li YX, Li SM, et al. Simultaneous determination of six flavonoids in extract of *Microctis Folium* by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 40-43.
- [8] Li ZY, He MY, Liu XX, et al. Study on the quantity value transfer of *Microctis Folium* decoction pieces and standard decoction based on UPLC fingerprint and multi-component quantification [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35: 1505-1517.
- [9] Yang Y, Li SG, Ye WC, et al. Studies on chemical constituents of *Microcos paniculata* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21: 2790-2792.
- [10] Xie CL, Lin JM, Zhao B, et al. Principal component analysis and cluster analysis of inorganic elements in *Microcos paniculata* by ICP-MS [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2019, 25: 53-55.
- [11] Shi LY. Chemical identification of *Microcos paniculata* [J]. *Guangxi J Tradit Chin Med* (广西中医药), 1993, (01): 40-41.
- [12] Bi HP, Zhou X, Chen GY, et al. Study on phenol-sulfuric acid method for determination of polysaccharide content in leave of *Microcos paniculata* L. [J]. *J Hainan Nor Univ* (海南师范大学学报), 2010, 23: 400-402.
- [13] Xiao GL, Jiang JY, Xu AL, et al. Difference in chemical components between *Microcos paniculata* from different producing areas based on ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analyses [J]. *Hunan J Tradit Chin Med* (湖南中医杂志), 2021, 37: 171-177.
- [14] Pan TL, Li KP, Lin ZF, et al. Contents of total flavonoids in *Microcos paniculata* L. and its radical-scavenging activity [J]. *J Guangdong Pharm Coll* (广东药学院学报), 2009, 25: 452-454.
- [15] Xiao GL, Jiang JY, Li SM, et al. Analysis of chemical constituents in *Microctis Folium* by UPLC-Q-TOP-MS/MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 138-148.
- [16] Pei K, Ning Y, Cai H, et al. Comparative study of *Chuanxiong Rhizoma* before and after processing based on HPLC fingerprints combined with chemical pattern recognition [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 1274-1283.
- [17] Meng XW, Cai DJ, Zhu Q, et al. Rapid identification and analysis of chemical components in heartwood of *Dalbergia cochinchinensis* by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 143-156.
- [18] Huang QM, Lin SL, Shi M, et al. Simultaneous determination of fifteen components in *Niu Huang Jiangya Pills* by UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2023, 58: 2777-2784.
- [19] Wang QY, Cheng XL, Li MH, et al. Research progress of LC-MS database technology and application in the field of traditional Chinese medicine analysis [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2021, 41: 1107-1113.
- [20] Liu YX, Lin Y, Xie JS, et al. Scientific connotation of "summer withering with good quality" based on dynamic monitoring of chemical constituents at different growth and development stages of *Prunella vulgaris* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 2082-2090.
- [21] Hu X, Wang HF, Yu FL, et al. Quality evaluation of *Blumea balsamifera* based on fingerprint analysis and quantitative analysis of multi-components [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 3679-3688.