

基于 UPLC 指纹图谱和多成分定量的布渣叶饮片 和标准汤剂量值传递研究

李振雨^{1,2*}, 何民友^{1,2}, 刘晓霞^{1,2},
曲丽媛^{1,2}, 周湘媛^{1,2}, 黄彩莹^{1,2}, 陈向东^{1,2}, 孙冬梅^{1,2}

¹广东一方制药有限公司; ²广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244

摘要: 研究布渣叶饮片到标准汤剂量值传递规律, 为布渣叶配方颗粒及其相关制剂质量标准的制定提供参考。采用 15 批布渣叶饮片制备标准汤剂, 测定标准汤剂出膏率、浸出物含量, 建立布渣叶饮片和标准汤剂超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱, 采用 Thermo Fisher QE 高分辨质谱对共有峰进行指认, 并采用对照品确证。以相对峰面积为变量, 对布渣叶饮片和标准汤剂指纹图谱进行正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 寻找差异变量, 并对布渣叶标准汤剂中 3 种黄酮类成分的含量和转移率进行测定。结果显示, 15 批布渣叶标准汤剂出膏率范围在 9.32% ~ 14.22%, 浸出物范围在 37.61% ~ 62.52%, 建立 15 批布渣叶饮片和标准汤剂指纹图谱, 相似度均在 0.95 以上, 饮片和标准汤剂指纹图谱均标识出 12 个保留时间相一致的共有峰, 并指认出其中 10 个化学成分, OPLS-DA 分析共找到 5 个相对峰面积变化较大的色谱峰, 分别为峰 1、2、3、4、6, 为酚酸和黄酮类成分。15 批标准汤剂 3 种黄酮类成分的含量均在均值 ± 3 倍 SD 范围内。其中牡荆苷的转移率最高, 其次为水仙苷和异牡荆苷。该研究能够为布渣叶配方颗粒及其相关制剂质量标准的制定提供重要参考。

关键词: 布渣叶; 饮片; 标准汤剂; 量值传递

中图分类号: R282.4; R927.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)9-1505-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.9.005

Study on the quantity value transfer of *Microctis Folium* decoction pieces and standard decoction based on UPLC fingerprint and multi-component quantification

LI Zhen-yu^{1,2*}, HE Min-you^{1,2}, LIU Xiao-xia^{1,2},
QU Li-yuan^{1,2}, ZHOU Xiang-yuan^{1,2}, HUANG Cai-ying^{1,2}, CHEN Xiang-dong^{1,2}, SUN Dong-mei^{1,2}

¹Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd.;

²Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China

Abstract: To provide reference for quality control of *Microctis Folium* formula granules and related preparations, the quantity value transfer rule from *Microctis Folium* decoction pieces to *Microctis Folium* standard decoction was studied. The standard decoction was prepared from 15 batches of *Microctis Folium* decoction pieces. The paste rate and extracts of 15 batches of *Microctis Folium* standard decoction were measured and the fingerprints of *Microctis Folium* decoction pieces and standard decoction were established by ultra high performance liquid chromatography (UPLC). The common peaks were identified using Thermo Fisher QE high-resolution mass spectrometry and confirmed using reference materials. Using the relative peak area as a variable, orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) was performed on the fingerprints of *Microctis Folium* decoction pieces and standard decoction to find difference variables and three flavonoids in *Microctis Folium* standard decoction were determined. The results showed that the paste rate of 15 batches of *Microctis Folium* standard decoction ranged

from 9.32% to 14.22% and the extracts ranged from 37.61% to 62.52%. The fingerprints of 15 batches of *Microctis Folium* decoction pieces and standard decoction were established with a similarity of more than 0.95. Twelve common peaks with consistent retention times were identified in the fingerprints of the decoction pieces and standard decoction and 10 chemical components were confirmed. OPLS-DA analysis found a total of 5 chromatographic peaks with significant changes in relative peak area, namely, peaks 1, 2, 3, 4 and 6. All of them were phenolic acids and flavonoids. The contents of three flavonoids in 15 batches of standard decoction were within the mean \pm 3 times SD range. The transfer rate of vitexin was the highest, followed by narcissin and isovitexin. This study can provide an important reference for the formulation of quality standards for *Microctis Folium* formula granules and related preparations.

Key words: *Microctis Folium*; decoction pieces; standard decoction; quantity value transfer

布渣叶为岭南特色药材,主要化学成分为黄酮、生物碱、萜类、有机酸等,具有促进胃肠蠕动和胃液分泌,降血脂,退黄,抗炎、镇痛、保护心血管,抗衰老等作用,为药食两用中药,最近几年对布渣叶的重视程度增加,研究也越来越多^[1]。

传统中药以汤剂为主要用药形式,汤剂为中药发挥药效的物质基础,并经过上千年的临床实践,因此,建立中药标准汤剂的质量标准,能够为中药配方颗粒等现代中药制剂质量标准的建立提供重要参考^[2]。目前,关于布渣叶标准汤剂的研究报道尚未见到,我司在进行布渣叶配方颗粒国家标准研究中,按照《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(以下简称技术要求),对标准汤剂的关键质量指标:出膏率、浸出物、指标性成分含量及转移率,指纹图谱进行研究,考察布渣叶饮片到标准汤剂的量值传递规律,为布渣叶配方颗粒及其相关制剂质量标准的制定提供参考。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器

Thermo 超高效液相色谱仪(Vanquish,赛默飞世尔科技有限公司);Thermo Vanquish Flex 超高效液相-Thermo Fisher QE 高分辨质谱联用仪(赛默飞世尔科技有限公司);Agilent ZORBAX SB C₁₈(2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μ m) 色谱柱,Waters Cortecs T3(2.1 mm \times 100 mm, 1.6 μ m) 色谱柱;百万分之一天平

(XP26,梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂

分析级甲醇和乙酸乙酯购自西陇科学股份有限公司;色谱级甲醇购自默克股份有限公司;色谱级甲酸和乙酸购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.3 试药

牡荆苷(批号:111687-201704,含量:94.9%)、水仙苷(批号:111997-201501,含量:93.1%)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(批号:112007-201602,含量:90.8%)、咖啡酸(批号:110885-201703,含量:99.7%)、阿魏酸(批号:110773-201614,含量:99.0%)和椴树苷(批号:112000-201802,供鉴别用)对照品均购自中国食品药品鉴定研究院;异牡荆苷(批号:ST09650120MG,含量:98.0%,上海诗丹德标准技术服务有限公司);对羟基肉桂酸(批号:JOT-10995,纯度:98.0%,四川普菲德生物技术有限公司);紫云英苷(批号:B21704,纯度:98.6%);异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(批号:B21556,纯度:99.6%)均购自上海源叶生物科技有限公司。15批布渣叶药材经广州中医药大学中药学院黄海波教授鉴定均为椴树科植物破布叶 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶。取15批布渣叶药材,去除杂质,制成布渣叶饮片,按照《技术要求》制备15批布渣叶标准汤剂,其产地信息见表1所示。

表1 15批布渣叶产地信息表

Table 1 Information on the origin of 15 batches of *Microctis Folium*

饮片编号 Decoction piece number	标准汤剂编号 Standard decoction number	产地 Origin
YP1	TJ1	广东省阳江市
YP2	TJ2	海南省五指山市
YP3	TJ3	海南省五指山市
YP4	TJ4	广东省阳江市

续表 1 (Continued Tab. 1)

饮片编号 Decoction piece number	标准汤剂编号 Standard decoction number	产地 Origin
YP5	TJ5	广东省阳江市
YP6	TJ6	广西壮族自治区玉林市
YP7	TJ7	广西壮族自治区玉林市
YP8	TJ8	广西壮族自治区玉林市
YP9	TJ9	广东省阳江市
YP10	TJ10	广东省湛江市
YP11	TJ11	广东省湛江市
YP12	TJ12	广东省湛江市
YP13	TJ13	广东省湛江市
YP14	TJ14	广东省茂名市
YP15	TJ15	广东省阳江市

2 方法与结果

2.1 布渣叶标准汤剂的制备

取布渣叶饮片 100 g,加水煎煮两次,第一次煎煮加水 14 倍量,浸泡 30 min,武火加热煮沸后文火保持微沸 30 min,趁热过滤,滤液迅速用冷水冷却;第二次煎煮加水 12 倍量,武火加热煮沸后文火保持微沸 25 min,趁热过滤,滤液迅速用冷水冷却,合并两次煎液,减压浓缩,冷冻干燥,得布渣叶标准汤剂冻干粉。

2.2 出膏率和浸出物测定

出膏率以标准汤剂冻干粉量计,计算公式为:出

膏率 = (标准汤剂冻干粉总量/制备标准汤剂的饮片重量) × 100%。浸出物的测定方法为:取本品 2 g,精密称定,精密加入乙醇 100 mL,照醇溶性浸出物(中国药典 2020 年版通则 2201)项下的热浸法测定,结果见表 2 所示。15 批布渣叶标准汤剂出膏率范围在 9.32% ~ 14.22%,浸出物范围在 37.61% ~ 62.52%,出膏率和浸出物数据均在均值的 70% ~ 130% 或均值 ± 3 倍标准差 (SD) 范围内,符合《技术要求》的规定。

表 2 15 批布渣叶标准汤剂出膏率和浸出物测定结果

Table 2 Determination results of paste rate and extracts of 15 batches of Microctis Folium standard decoction

标准汤剂编号 Standard decoction number	出膏率 Paste rate(%)	浸出物 Extract(%)
TJ1	9.61	39.26
TJ2	14.22	60.05
TJ3	13.14	58.30
TJ4	12.39	56.10
TJ5	9.89	40.47
TJ6	9.32	37.61
TJ7	13.41	51.81
TJ8	13.71	54.61
TJ9	10.46	46.59
TJ10	13.61	58.05
TJ11	13.55	57.31
TJ12	13.51	62.52
TJ13	10.40	40.68

续表 2(Continued Tab. 2)

标准汤剂编号 Standard decoction number	出膏率 Paste rate(%)	浸出物 Extract(%)
TJ14	10.99	39.43
TJ15	9.57	39.99
最小值 Minimum value	9.32	37.61
最大值 Maximum value	14.22	62.52
均值 Mean value	11.85	49.52
标准差 Standard deviation(SD)	1.84	9.15
均值的 70% ~ 130% 70%-130% of the mean	8.30 ~ 15.41	34.66 ~ 64.37
均值 \pm 3 倍 SD Mean \pm 3SD	6.33 ~ 17.37	22.05 ~ 76.98

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μ m) 色谱柱;以甲醇为流动相 A, 0.1% 乙酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 33 min, 9% \rightarrow 17% A; 33 ~ 37 min, 17% \rightarrow 25% A; 37 ~ 45 min, 25% \rightarrow 28% A; 45 ~ 60 min, 28% \rightarrow 80% A); 流速为每分钟 0.30 mL; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 检测波长为 315 nm; 进样量为 2 μ L。

2.3.2 对照品溶液的制备

取咖啡酸、对羟基肉桂酸、阿魏酸、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、紫云英苷、水仙苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷和鞣树苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含咖啡酸、阿魏酸、牡荆苷、异牡荆苷各 15 μ g、含山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、鞣树苷各 40 μ g、含对羟基肉桂酸、紫云英苷和异鼠李素-3-O-葡萄糖苷各 50 μ g 的混合溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备

2.3.3.1 布渣叶饮片供试品溶液的制备

取本品粉末(过三号筛)约 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加 50% 甲醇 25 mL, 加热回流 30 min, 冷却, 离心, 取上清液蒸干, 残渣加 25 mL 水使溶解, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 25 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣用 50% 甲醇溶解, 并定容到 10 mL 量瓶, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.3.2 布渣叶标准汤剂供试品溶液的制备

取本品适量, 研细, 取约 0.1 g, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 25 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 45 min, 离心, 取上清液蒸干, 残渣加 25 mL 水使溶解, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 25 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 定容到 10 mL 量

瓶, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.3.4 指纹图谱方法学验证

2.3.4.1 精密密度试验

取布渣叶标准汤剂(编号:TJ2)供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 以 5 号峰牡荆苷为参照峰 S, 计算其余共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.04% ~ 1.53% 范围内, 相对峰面积 RSD 值在 0.34% ~ 2.41% 范围内, 表明仪器精密密度良好。

2.3.4.2 重复性试验

取布渣叶标准汤剂(编号:TJ2)约 0.1 g, 平行 6 份, 精密称定, 按“2.3.3.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 采用“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 以 5 号峰牡荆苷为参照峰 S, 计算其余共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.05% ~ 0.52% 范围内, 相对峰面积 RSD 值在 1.14% ~ 2.84% 范围内, 表明该方法重复性良好。

2.3.4.3 稳定性试验

取“2.3.4.2 重复性试验”项下供试品溶液, 采用“2.3.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析, 以 5 号峰牡荆苷为参照峰 S, 计算其余共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.03% ~ 0.47% 范围内, 相对峰面积 RSD 值在 0.63% ~ 2.94% 范围内, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 指纹图谱的建立

采用“2.3”项下指纹图谱方法, 对 15 批布渣叶饮片和标准汤剂样品进行指纹图谱测定, 采用赛默飞 Chromleon 7 软件将各批次样品指纹图谱以 CDF 格式导出, 并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723)》, 分别以 YP1 和 TJ1 样品指纹图谱为参照图谱, 对 15 批布渣叶饮片和标准汤

剂指纹图谱进行多点校正和峰匹配,并生成布渣叶饮片和标准汤剂对照指纹图谱,结果见图 1~3 所示。结果显示,15 批布渣叶饮片和标准汤剂均标识

出 12 个保留时间相一致的共有指纹峰,表明从布渣叶饮片到标准汤剂,各指纹峰所代表的化学成分均能进行有效的转移。

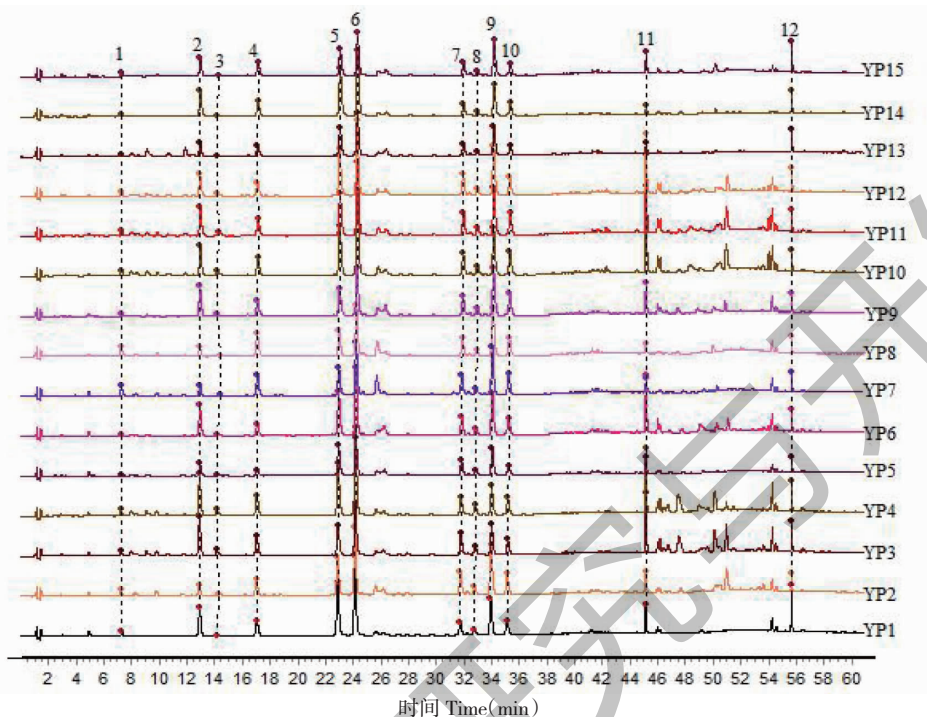


图 1 15 批布渣叶饮片指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of 15 batches of *Microctis Folium* decoction pieces

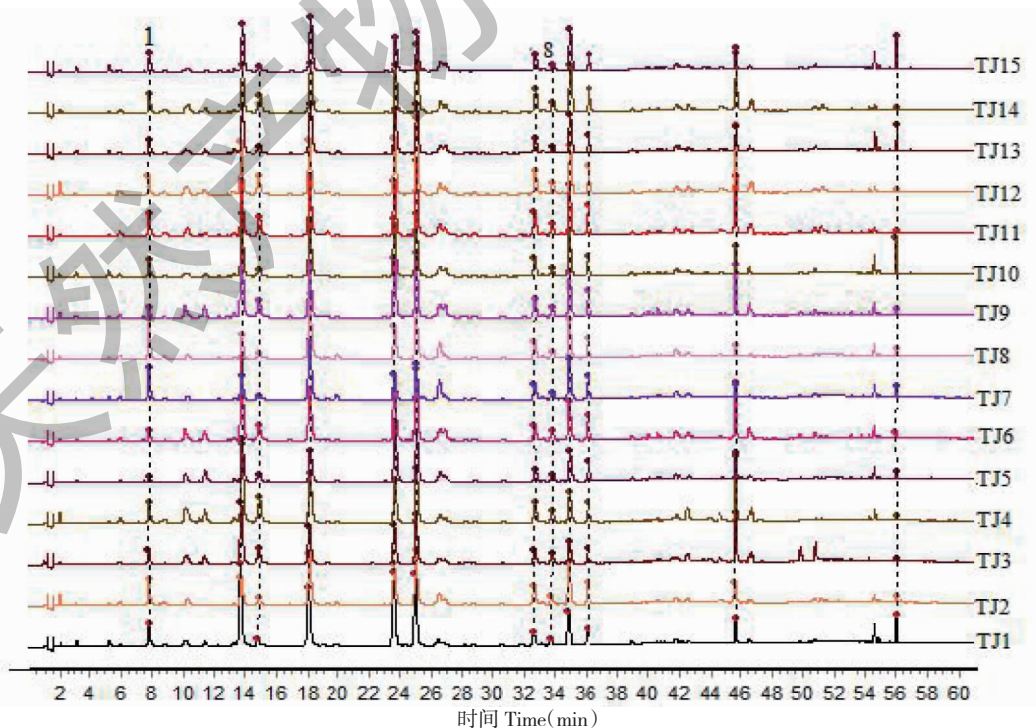


图 2 15 批布渣叶标准汤剂指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of 15 batches of *Microctis Folium* standard decoction

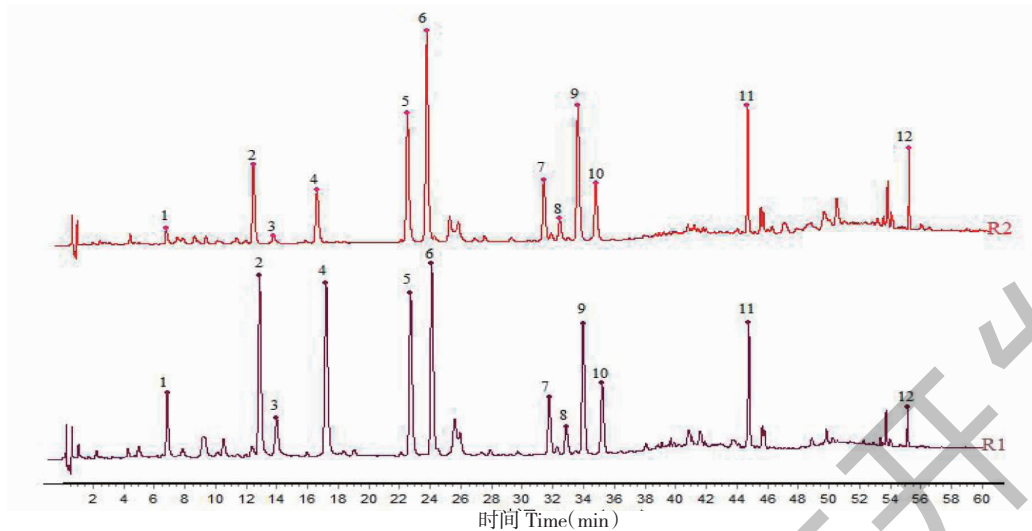


图3 布渣叶饮片和标准汤剂对照指纹图谱

Fig. 3 Reference fingerprints of *Microctis Folium* decoction pieces and standard decoction

注: R1: 标准汤剂对照指纹图谱, R2: 饮片对照指纹图谱。Note: R1: Reference fingerprint of standard decoction; R2: Reference fingerprint of decoction pieces.

2.3.6 相似度计算

分别计算 15 批布渣叶饮片和标准汤剂样品指纹图谱与其对照指纹图谱的相似度, 结果见表 3 所示, 15 批布渣叶饮片指纹图谱的相似度在 0.957 ~

0.995, 15 批布渣叶标准汤剂指纹图谱的相似度在 0.960 ~ 0.995, 饮片和标准汤剂指纹图谱整体相似度较高, 表明指纹图谱可作为共性特征, 用于布渣叶饮片和标准汤剂的质量控制。

表 3 相似度计算结果

Table 3 Similarity calculation results

饮片编号 Decoction piece number	相似度 Similarity	标准汤剂编号 Standard decoction number	相似度 Similarity
YP1	0.981	TJ1	0.976
YP2	0.984	TJ2	0.972
YP3	0.957	TJ3	0.975
YP4	0.966	TJ4	0.969
YP5	0.986	TJ5	0.967
YP6	0.989	TJ6	0.983
YP7	0.968	TJ7	0.962
YP8	0.958	TJ8	0.960
YP9	0.976	TJ9	0.986
YP10	0.995	TJ10	0.993
YP11	0.987	TJ11	0.992
YP12	0.995	TJ12	0.986
YP13	0.992	TJ13	0.995
YP14	0.972	TJ14	0.988
YP15	0.993	TJ15	0.977

2.3.7 共有峰的指认

取布渣叶标准汤剂(编号:TJ2)供试品溶液, 采

用液相色谱-高分辨质谱对共有峰进行指认, 色谱条件均同“2.3.1”项下; 质谱采用 HESI 离子源, 离子

源参数为:鞘气流速 35 Arb;辅助气流速 10 arb;喷雾电压 3.2 kV;S-lens 电压 50 V;辅助器加热温度 350 ℃;毛细管加热温度 350 ℃。质谱扫描参数为:正、负离子扫描模式(dd-MS² Discover);扫描范围为 100 ~ 1 500 *m/z*;一级扫描分辨率为 70 000 FWHM;

二级扫描分辨率为 17 500 FWHM;二级碰撞能量为 40 eV。分别采集供试品溶液在正、负离子模式下总离子流图(total ion chromatogram, TIC)及紫外吸收色谱图(见图 4)。

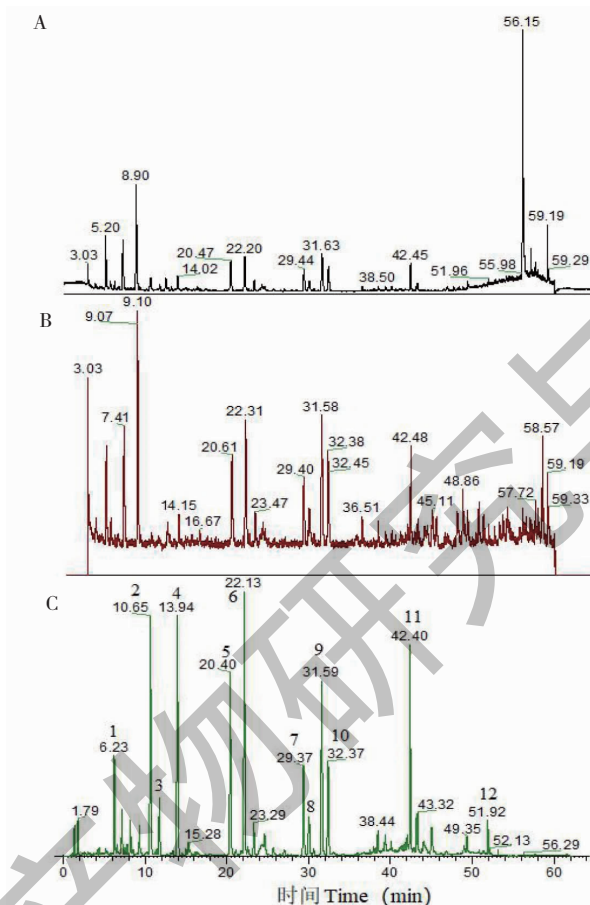


图 4 布渣叶标准汤剂指纹图谱共有峰的指认

Fig. 4 Identification of common peaks in fingerprint of *Microctis Folium* standard decoction

注:A:负离子模式下 TIC;B:正离子模式下 TIC;C:UV 315nm 下色谱图。Note:A:TIC in negative ion mode;B:TIC in positive ion mode;C:Chromatogram at UV 315 nm.

通过化合物的精确分子量及二级质谱信息,结合本地质谱数据库资料及相关参考文献,推测峰 1 为咖啡酸,峰 2 为对羟基肉桂酸,峰 4 为阿魏酸,峰 5 为牡荆苷,峰 6 为异牡荆苷,峰 7 为山柰酚-3-*O*-芸

香糖苷,峰 8 为紫云英苷,峰 9 为水仙苷,峰 10 为异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷,峰 11 为椴树苷。具体化合物信息见表 4 所示。

表 4 布渣叶标准汤剂化学成分质谱鉴定结果

Table 4 Mass spectrometry identification results of *Microctis Folium* standard decoction

峰号 Peak No.	化合物 Compound	<i>t_R</i> (min)	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value (<i>m/z</i>)	误差 Error (<i>m/z</i>)	主要碎片离子 Main fragmentation (<i>m/z</i>)
1	咖啡酸 Caffeic acid	6.23	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.033 9	-0.008 4	135.043 8
2	对羟基肉桂酸 4-Hydroxycinnamic acid	10.65	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	163.038 9	-0.008 4	119.048 9

续表 4(Continued Tab. 4)

峰号 Peak No.	化合物 Compound	t_R (min)	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error (m/z)	主要碎片离子 Main fragmentation (m/z)
4	阿魏酸 Ferulic acid	13.94	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	193.049 7	-0.008 2	145.028 3、 177.054 3、 117.033 6
5	牡荆苷 Vitexin	20.40	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	431.098 0	-0.007 6	313.070 4、 283.059 7
6	异牡荆苷 Isovitexin	22.13	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	431.098 0	-0.007 6	313.070 4、 283.059 7
7	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	29.37	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M-H]^-$	593.151 2	-0.007 3	285.039 9、 255.029 8 284.032 7、
8	紫云英苷 Astragaln	30.12	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	447.093 2	-0.007 4	255.029 7、 227.034 4
9	水仙苷 Narcissin	31.59	$C_{28}H_{32}O_{16}$	$[M-H]^-$	623.161 9	-0.007 1	317.065 3、 302.041 9
10	异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	32.37	$C_{22}H_{22}O_{12}$	$[M-H]^-$	477.103 6	-0.007 5	317.065 3、 302.041 9
11	椴树苷 Tiliroside	42.40	$C_{30}H_{26}O_{13}$	$[M-H]^-$	593.130 3	-0.007 0	177.054 5、 163.038 8、 145.028 3

2.3.8 共有峰的对照品确证

取布渣叶标准汤剂(编号:TJ3)供试品溶液和“2.3.2”项下对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,采用保留时间比对结合紫外-可见光 3D 光谱分析,进一步确证峰 1 为咖啡酸,峰 2 为对羟基

肉桂酸,峰 4 为阿魏酸,峰 5 为牡荆苷,峰 6 为异牡荆苷,峰 7 为山柰酚-3-*O*-芸香糖苷,峰 8 为紫云英苷,峰 9 为水仙苷,峰 10 为异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷,峰 11 为椴树苷,结果见图 5 所示。

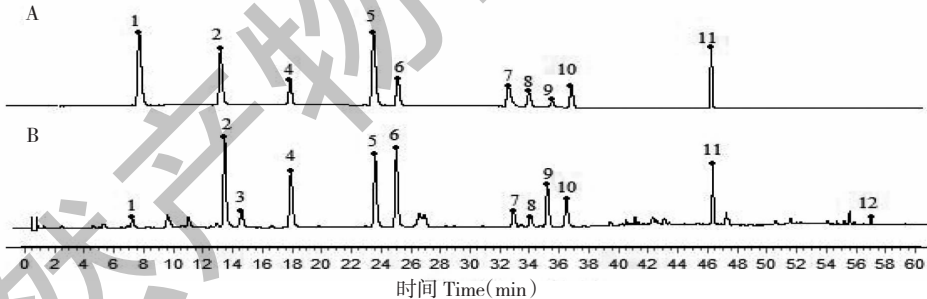


图 5 共有峰的对照品确证

Fig. 5 Identification of reference substances for common peaks

注:A:混合对照品,B:供试品。1:咖啡酸;2:对羟基肉桂酸;4:阿魏酸;5:牡荆苷;6:异牡荆苷;7:山柰酚-3-*O*-芸香糖苷;8:紫云英苷;9:水仙苷;10:异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷;11:椴树苷。Note:A: Mixed reference; B: Sample. 1: Caffeic acid; 2: 4-Hydroxycinnamic acid; 4: Ferulic acid; 5: Vitexin; 6: Isovitexin; 7: Kaempferol-3-*O*-rutinoside; 8: Astragaln; 9: Narcissin; 10: Isorhamnetin-3-*O*-glucoside; 11: Tiliroside.

2.3.9 化学计量学分析

以 5 号峰牡荆苷为参照峰 S,分别计算峰 1~4、峰 6~12 与 S 峰的相对峰面积,并以相对峰面积为变量采用 Simca14.1 软件进行正交偏最小二乘法判别式分析(OPLS-DA),建立 OPLS-DA 模型,模型经过 200 次置换检验, R^2 和 Q^2 值右边均大于左边(见图 6),证实模型有效。采用 Simca14.1 软件自

动生成 OPLS-DA 得分图(见图 7),15 批布渣叶饮片和标准汤剂各自归为一类,且样品集中度较高。以 $VIP > 1.0$ 作为变量差异性筛选标准,15 批布渣叶饮片和标准汤剂共筛选出 5 个差异标志物(见图 8),以 VIP 大小排序,分别为峰 4 > 峰 6 > 峰 2 > 峰 3 > 峰 1。分别计算 15 批布渣叶饮片和标准汤剂中峰 1、2、3、4、6 与 S 峰的相对峰面积,并计算 15 批样品

的相对峰面积均值(见表 5)。结果显示,从饮片到 6 的相对峰面积则明显下降。标准汤剂峰 1、2、3、4 的相对峰面积明显增加,而峰

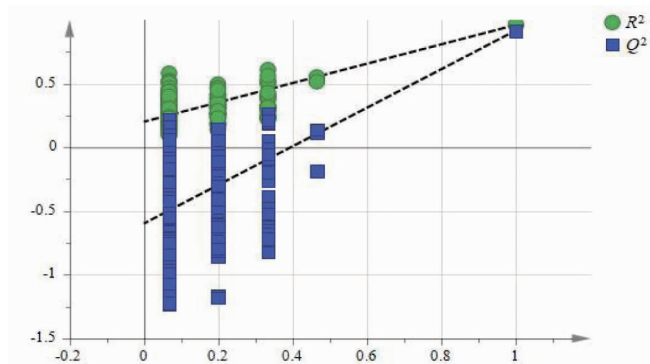


图 6 OPLS-DA 模型置换检验
Fig. 6 OPLS-DA model replacement test

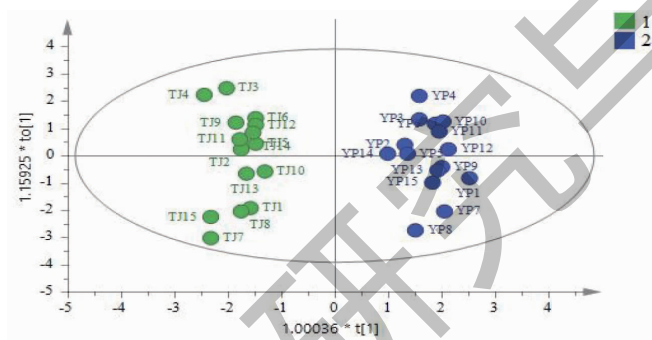


图 7 OPLS-DA 得分图
Fig. 7 OPLS-DA score plot

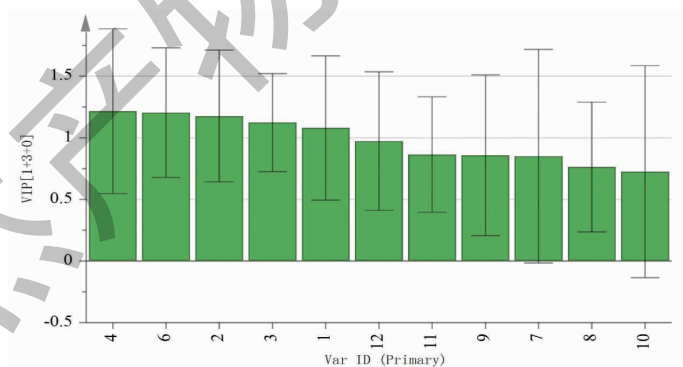


图 8 VIP 得分图
Fig. 8 VIP score plot

表 5 峰 1、2、3、4、6 与 S 峰的相对峰面积均值
Table 5 Average relative peak area of peaks 1,2,3,4,6 and S

峰号 Peak No.	饮片 Decoction piece	标准汤剂 Standard decoction
1	0.100	0.255
2	0.477	1.056
3	0.081	0.234

续表 5 (Continued Tab. 5)

峰号 Peak No.	饮片 Decoction piece	标准汤剂 Standard decoction
4	0.450	1.288
5(S)	1.000	1.000
6	1.452	1.098

2.4 牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷的含量测定

2.4.1 色谱条件

采用 Waters Cortecs T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm) 色谱柱; 以甲醇为流动相 A, 0.1% 甲酸溶液为流动相 B; 梯度洗脱 (0 ~ 6 min, 20% → 25% A; 6 ~ 24 min, 25% → 32% A; 24 ~ 32 min, 32% → 40% A; 32 ~ 35 min, 40% → 44% A); 流速为每分钟 0.35 mL; 柱温为 30 °C; 检测波长为 339 nm, 进样量为 1 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备

精密称取牡荆苷对照品 2.913 mg、异牡荆苷对照品 5.197 mg、水仙苷对照品 16.773 mg, 加 70% 甲醇制成每 1 mL 含牡荆苷 13.822 μg、异牡荆苷 25.465 μg、水仙苷 78.078 μg 的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备

2.4.3.1 布渣叶饮片供试品溶液的制备

取本品粉末 (过三号筛) 约 2.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 (250 W, 频率 40 kHz) 1 h, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4.3.2 布渣叶标准汤剂供试品溶液的制备

取布渣叶标准汤剂适量, 研细, 取约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4.4 方法学验证

2.4.4.1 精密度考察

精密吸取“2.4.2”项下混合对照品溶液, 按照“2.4.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 计算牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷的色谱峰面积 RSD 分别为 0.27%、0.57% 和 0.62%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4.2 重复性考察

取布渣叶标准汤剂 (编号: TJ2) 约 0.1 g, 平行 6 份, 精密称定, 按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 计算供试品溶液中牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷的含量均值为 2.761、3.290 和 13.920 mg/g, RSD 值分别为 1.83%、0.97% 和 0.92%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4.3 线性关系考察

精密称取牡荆苷对照品 2.913 mg、异牡荆苷对照品 5.197 mg、水仙苷对照品 16.773 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇制成每 1 mL 含牡荆苷 276.444 μg、含异牡荆苷 509.306 μg、含水仙苷 1561.566 μg 的混合对照品储备液。精密量取上述混合对照品储备液 0.5 mL, 置 2、5、10、25、50 mL 量瓶中, 分别加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 制成系列浓度对照品应用液, 取上述对照品储备液和应用液, 按“2.4.1”项下色谱条件依次进样分析, 记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 结果见表 6 所示。结果显示, 3 种成分的线性回归方程相关系数 r 均大于 0.999 5, 表明各成分在规定的对照品浓度范围内, 峰面积与对照品浓度线性关系良好。

表 6 各成分线性考察结果

Table 6 Linear relationship results of each component

成分 Component	回归方程 Regression equation	r	线性范围 Linear range (μg/mL)
牡荆苷 Vitexin	$Y = 7385.273X - 4091.821$	0.999 9	2.764 ~ 276.444
异牡荆苷 Isovixetin	$Y = 9297.332X - 1212.080$	0.999 9	5.093 ~ 509.306
水仙苷 Narceissin	$Y = 4665.419X - 22676.221$	0.999 9	15.616 ~ 1561.566

2.4.4.4 加样回收率试验

取牡荆苷对照品 2.794 mg、异牡荆苷对照品 3.627 mg、水仙苷对照品 15.224 mg,置 20 mL 量瓶中,加甲醇制成 1 mL 含牡荆苷 132.575 μg 、异牡荆苷 177.723 μg 、水仙苷 708.677 μg 的对照品储备液。精密吸取上述对照品储备液 0.5、1.0、1.5 mL,平行 3 组,每组 3 份,分别置 9 个锥形瓶中挥干溶剂,

精密加入含量已知的布渣叶标准汤剂(编号:TJ2)约 0.05 g,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液 9 份,按“2.4.1”项下色谱条件测定,计算牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷的加样回收率和 RSD 值,结果见表 7 所示。各成分的加样回收率 RSD 值均小于 4.0%,表明该方法准确度良好。

表 7 各成分加样回收率测定结果

Table 7 Determination results of recovery rate of each component

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample weight (g)	已知量 Known quantity (mg)	测得量 Measured quantity (mg)	对照品加入量 Reference substance added amount (mg)	回收率 Recovery rate(%)	均值 Average(%)	RSD(%)
牡荆苷 Vitexin	1	0.051 4	0.141 9	0.205 5	0.066 3	95.93	95.97	3.08
	2	0.054 3	0.149 9	0.209 6	0.066 3	90.05		
	3	0.050 0	0.138 1	0.201 6	0.066 3	95.78		
	4	0.054 8	0.151 3	0.277 9	0.132 6	95.48		
	5	0.052 1	0.143 8	0.269 2	0.132 6	94.57		
	6	0.057 2	0.157 9	0.283 3	0.132 6	94.57		
	7	0.056 1	0.154 9	0.353 6	0.198 9	99.90		
	8	0.057 4	0.158 5	0.354 9	0.198 9	98.74		
	9	0.056 9	0.157 1	0.353 4	0.198 9	98.69		
异牡荆苷 Isovitexin	1	0.051 4	0.169 1	0.261 6	0.088 9	104.05	101.73	1.44
	2	0.054 3	0.178 6	0.267 9	0.088 9	100.45		
	3	0.050 0	0.164 5	0.253 6	0.088 9	100.22		
	4	0.054 8	0.180 3	0.359 4	0.177 7	100.79		
	5	0.052 1	0.171 4	0.356 1	0.177 7	103.94		
	6	0.057 2	0.188 2	0.366 7	0.177 7	100.45		
	7	0.056 1	0.184 6	0.457 4	0.266 6	102.33		
	8	0.057 4	0.188 8	0.460 3	0.266 6	101.84		
	9	0.056 9	0.187 2	0.457 8	0.266 6	101.50		
水仙苷 Narcissin	1	0.051 4	0.715 5	1.073 0	0.354 3	100.90	99.45	2.44
	2	0.054 3	0.755 9	1.124 6	0.354 3	104.06		
	3	0.050 0	0.696 0	1.058 2	0.354 3	102.23		
	4	0.054 8	0.762 8	1.460 1	0.708 7	98.39		
	5	0.052 1	0.725 2	1.411 9	0.708 7	96.90		
	6	0.057 2	0.796 2	1.486 7	0.708 7	97.43		
	7	0.056 1	0.780 9	1.832 3	1.063 0	98.91		
	8	0.057 4	0.799 0	1.846 8	1.063 0	98.57		
	9	0.056 9	0.792 0	1.830 1	1.063 0	97.66		

2.4.4.5 稳定性试验

精密吸取“2.3.4.2 重复性试验”项下供试品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、

12、24 h 进样分析,测定供试品溶液中牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷的峰面积,并计算峰面积 RSD 值分别为 2.10%、0.46% 和 0.64%,表明供试品溶液在 24

h 内稳定性良好。

2.4.5 样品含量测定及转移率计算

采用“2.4.3”项下供试品溶液制备方法和“2.4.1”项下色谱条件,分别对 15 批布渣叶饮片和标准汤剂中牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷的含量进行测定,并计算转移率,结果见表 8 所示。15 批布渣叶标准汤剂牡荆苷的含量范围为 1.63 ~ 4.68 mg/g,异牡荆苷的含量范围为 2.16 ~ 4.25 mg/g,水仙

苷的含量范围为 7.86 ~ 14.18 mg/g,3 种有效成分的含量均在均值 ± 3 倍标准差(SD)范围内;牡荆苷的转移率范围为 41.37% ~ 68.13%,异牡荆苷的转移率范围为 31.05% ~ 53.10%,水仙苷的转移率范围为 33.11% ~ 59.20%,3 种有效成分的转移率均在均值 ± 3 倍标准差(SD)的范围内,均符合《技术要求》的规定。

表 8 15 批布渣叶标准汤剂含量及转移率测定结果

Table 8 Determination results of content and transfer rate of 15 batches of Microctis Folium standard decoction

标准汤剂编号 Standard decoction number	牡荆苷含量		转移率 Transfer rate(%)	异牡荆苷含量		转移率 Transfer rate(%)	水仙苷含量		转移率 Transfer rate(%)
	Vitexin content(mg/g)			Isovitexin content(mg/g)			Narcissin content(mg/g)		
	饮片 Decoction pieces	标准汤剂 Standard decoction		饮片 Decoction pieces	标准汤剂 Standard decoction		饮片 Decoction pieces	标准汤剂 Standard decoction	
TJ1	0.81	4.68	59.49	1.07	4.25	40.70	2.42	10.92	46.20
TJ2	0.57	2.81	68.84	0.96	3.35	50.45	3.58	14.18	54.45
TJ3	0.54	2.74	67.83	0.92	3.70	53.10	2.41	10.73	59.20
TJ4	0.60	2.81	58.35	1.14	3.40	37.09	2.58	9.70	46.86
TJ5	0.47	3.18	68.13	0.66	2.41	36.90	2.18	7.86	36.06
TJ6	0.60	3.80	62.08	0.88	3.62	40.17	3.19	11.87	36.21
TJ7	0.42	1.63	54.68	0.82	2.16	37.24	4.00	12.20	42.92
TJ8	0.44	1.77	56.63	0.95	2.42	35.48	4.43	10.72	33.86
TJ9	0.50	3.14	67.62	0.81	3.56	47.66	4.51	13.74	33.11
TJ10	0.66	2.59	55.22	1.18	3.40	40.57	3.41	12.67	52.35
TJ11	0.53	2.47	65.46	1.10	3.52	44.63	3.38	12.88	53.28
TJ12	0.71	3.36	66.14	1.22	4.18	47.62	4.01	13.84	48.09
TJ13	0.48	2.40	54.75	0.80	2.49	34.55	2.28	11.38	54.94
TJ14	0.95	3.35	41.37	1.21	3.20	31.05	2.87	12.24	49.56
TJ15	0.43	2.25	53.18	0.68	2.34	35.12	2.66	12.49	47.69
均值 Mean value	0.58	2.86	59.98	0.96	3.20	40.82	3.19	11.83	46.32
标准差 standard deviation(SD)	0.15	0.77	7.66	0.19	0.68	6.49	0.79	1.68	8.26
均值的 70% ~ 130% 70% -130% of the mean	-	2.01 ~ 3.72	41.99 ~ 77.98	-	2.24 ~ 4.16	28.58 ~ 53.07	-	8.28 ~ 15.38	32.42 ~ 60.21
均值 ± 3 倍 SD Mean ± 3 SD	-	0.54 ~ 5.19	37.00 ~ 82.97	-	1.17 ~ 5.23	21.35 ~ 60.29	-	6.79 ~ 16.87	21.53 ~ 71.11

3 讨论与结论

布渣叶质地较轻,但化学成分复杂,饮片煎煮过程中大量成分溢出,导致标准汤剂杂质较多,影响有效成分的色谱分离与分析,采用甲醇、乙醇等极性较大的溶剂对标准汤剂进行处理时,指纹图谱基线不平稳、色谱峰分离度较差,色谱峰杂乱,小峰较多。因此,在标准汤剂供试品前处理方法中,考察了乙酸乙酯萃取的分离纯化富集方式,减少杂质的干扰,并与常规处理方式进行对比,结果显示,采用乙酸乙酯为萃取溶剂,能够显著改善杂质峰的影响,保证主要

色谱峰的纯度、分离度,解决色谱图基线不平稳,部分色谱峰吸收小的问题。在色谱条件的考察中,分别考察不同的流动相洗脱系统,如乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%乙酸溶液、甲醇-0.1%甲酸溶液、甲醇-0.1%乙酸溶液等,结果显示,采用甲醇-0.1%乙酸溶液为洗脱系统,色谱峰的个数多且整体分离度较好。考虑到超高效液相色谱指纹图谱的建立,色谱柱的选择是关键,因此,本实验考察了不同粒径和品牌的色谱柱,最终选择 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μ m),各共有指纹峰

的峰形及分离度最佳。

研究显示,布渣叶含有众多黄酮类成分,Xiao 等^[3]采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术成功从布渣叶中鉴定出 31 种化合物,其中 28 种为黄酮类,3 种为酚酸类成分。药理学研究表明,黄酮类成分是布渣叶发挥消食化滞、清热利湿的重要物质基础^[4-8],其代表性成分如牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷等,在布渣叶中含量较高,且在水中具有一定的溶解性,因此,布渣叶标准汤剂以牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷为含量测定指标,并以汤剂为基础建立布渣叶饮片的含量测定方法,从而指导标准汤剂的量值传递研究。

布渣叶药材主要分布在广东、广西和海南,属于广东产道地药材。15 批布渣叶药材均采自上述 3 个产地,具有充分的代表性。从 15 批标准汤剂出膏率、浸出物以及 15 批布渣叶饮片 3 种黄酮类成分的测定结果来看,不同批次的样品存在一定的差异,最大值和最小值相差 2 倍左右,这种差异与药材本身质量有关,符合《技术要求》的规定,未出现明显异常值。

从转移率测定结果来看,3 种黄酮类成分的转移率均值在 40% ~ 60% 之间,以牡荆苷的转移率最高,其次为水仙苷和异牡荆苷,转移率整体比较稳定。指纹图谱研究结果显示,从布渣叶饮片到标准汤剂,共有峰的比例产生一定的变化,OPLS-DA 分析共找到 5 个差异显著性色谱峰,分别为峰 1、2、3、4、6,除峰 3 未鉴别,其余色谱峰均已知,其中峰 1、2、4 为酚酸类成分,因此,峰 3 推测也为一种酚酸类。酚酸类成分在植物中是一种特殊的存在,既能作为合成其他化合物的前体^[9],也能由多种化合物水解产生^[10-13],因此,布渣叶标准汤剂中酚酸类成分相对峰面积的明显增加,考虑是在标汤煎煮过程中,由其他成分水解产生。峰 6 异牡荆苷与 S 峰牡荆苷的结构类似,极性相差不大,但转移率却有较大差异,考虑标准汤剂在煎煮过程中牡荆苷与异牡荆苷存在一定的相互转化,有待于进一步研究。

本次研究以布渣叶标准汤剂的关键质量指标为基础,对布渣叶饮片标准汤剂的量值传递进行深入的研究与分析,为布渣叶配方颗粒及其相关制剂质量标准的制定提供重要参考。

参考文献

1 Sun DM, Wang MX. Advances on chemical constituents and pharmacological effects of *Microcos paniculata* [J]. World Tradit Chin Med(世界中医药), 2015, 10: 143-147.

2 Deng Z, Jing WG, Wang SH, et al. Discussion and research progress in standard decoction of medicinal slices [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44: 242-248.

3 Xiao GL, Jiang JY, Li SM, et al. Analysis of chemical constituents in *Microctis Folium* by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 138-148.

4 Pu SQ. Componential analysis and pharmacodynamics observation of total flavonoids from Lingnan herb *Microcos Folium* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2020.

5 Li CL. Lipid lowering activity of total flavonoids fraction of *Microcos paniculata* and the corresponding qualitative and quantitative analysis of apigenin-C-glycosides [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University(广东药科大学), 2017.

6 Dai WB. Study on pharmacodynamics of relieve fever, promoting digestion and reducing jaundice of *Folium Microctis* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2010.

7 Huang L. Study on the effect and medianism of regulating blood lipid of *microcos paniculata* flavonoids dispersion tablets [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2016.

8 Cheng QY. A study of the chromatogram-effect relationship on the anti-hyperlipidemia effects of the total flavonoids in *Microcos paniculata* L. [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2014.

9 Bao YF, S XC, W F. The research progress and development prospects of biosynthesis, structure activity relationship and biological activity of caffeic acid and its main types of derivatives [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 1825-1833.

10 Chen XY. Study on Hydrolysates of acteoside *in vitro* and its inhibition of xanthine oxidase [D]. Nanchang: Nanchang University(南昌大学), 2015.

11 Li SS, Zhang XN, Zhou LH, et al. Research progress on salvianolic acids' degradation and transformation in aqueous solution from *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2020, 22: 109-117.

12 Zhao MJ, Li CC, Gan L, et al. HPLC determination of eight hydrolytic constituents of *Polygalae Radix* [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2020, 22: 391-397.

13 Zhang QQ, Li SQ, Zhou LH, et al. Research progress on self-oxidation and polymerization mechanism, products and pharmacological activities of small-molecule phenolic acids such as caffeic acid [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2021, 23: 555-561.