

一测多评法测定柿叶提取物中 6 种黄酮类成分

郭海彪^{1,2}, 董福越¹, 李雯珊¹, 李楚源¹, 王德勤^{1*} (1.广州白云山和记黄埔中药有限公司现代中药研究院, 广州 510515; 2.中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 目的 建立一测多评(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)法同时测定柿叶提取物中 6 种黄酮类成分的含量。方法 采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 360 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。应用 QAMS 法, 以槲皮素为内参物, 测定 5 种黄酮类成分之间的相对校正因子, 分别采用外标法和 QAMS 法测定柿叶提取物中的 6 种指标性成分的含量, 并对 2 种方法计算结果进行对比分析, 以验证 QAMS 法的实用性与稳定性。结果 建立了用于测定柿叶提取物中 6 种黄酮类成分的 QAMS 法, 各成分相对校正因子的稳定性和重复性良好, QAMS 法和外标法的测定值差异较小。结论 本研究建立的一测多评法测定柿叶提取物中 6 种黄酮类成分, 方便快捷, 结果准确可靠, 可用于柿叶提取物多指标成分的质量控制。

关键词: 柿叶提取物; 一测多评法; 槲皮素; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 槲皮苷; 杨梅素; 山柰酚

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)07-0831-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.010

引用本文: 郭海彪, 董福越, 李雯珊, 等. 一测多评法测定柿叶提取物中 6 种黄酮类成分[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 831-835.

Determination of Six Flavonoids in Extract of *Diospyros Kaki* Thunb. Leaves by QAMS

GUO Haibiao^{1,2}, DONG Fuyue¹, LI Wenshan¹, LI Chuyuan¹, WANG Deqin^{1*} (1. Institute of Modern Chinese Medicine of Guangzhou Baiyun Mountain and Hutchison Whampoa Ltd., Guangzhou 510515, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method of quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS) for simultaneous determination of six flavonoids in extract of *Diospyros kaki* Thunb. leaves. **METHODS** The Agilent Eclipse Plus C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was applied, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid of gradient elution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 360 nm, the column temperature was 30 °C and the injection volume was 10 μL. Used quercetin as a reference, the relative correction factors among the five flavonoids were detected by QAMS. The content of six index components in extract of *Diospyros kaki* Thunb. leaves. was determined by external standard method and QAMS. The results obtained from two different methods were compared, verified the practicability and stability of QAMS. **RESULTS** The QAMS was established and used to determine the six flavonoids in the extract of *Diospyros kaki* Thunb. leaves. The results showed that the relative correction factors had good system applicability and reproducibility, and there was no significant difference between method QAMS and external standard method. **CONCLUSION** The established QAMS method for simultaneous determination of six flavonoids in extract of *Diospyros kaki* Thunb. leaves is simple, accurate, reproducible and feasible to quantify multiple components in extract of *Diospyros kaki* Thunb. leaves.

KEYWORDS: extract of *Diospyros kaki* Thunb. leaves; QAMS; quercetin; hyperoside; isoquercitrin; quercitrin; myricetin; kaempferol

柿叶为柿科植物柿(*Diospyros kaki* Thunb.)的新鲜或干燥叶, 作为药用始见于《滇南本草》记载“经霜叶敷臙疮”, 《本草再新》记载用于“治咳嗽吐血, 止渴生津”, 历代本草及医药书籍均有记载^[1]。现代药理学研究显示, 柿叶中含有黄酮类、有机酸和香豆素类等多种成分, 具有降血糖、抗氧化、抗菌、抗肿瘤、调血脂、保肝等药理作用^[2-3]。以柿叶为原料, 经水提醇沉、乙酸乙酯萃取制备

的柿叶提取物具有活血化瘀、通络的功效, 在临床上广泛应用于冠心病、脑动脉硬化症等心脑血管疾病^[4]。有研究表明, 柿叶提取物防治心脑血管疾病的药效物质基础是黄酮类成分^[5], 因此, 中国药典中柿叶提取物含量测定项下也规定了其总黄酮量下限^[6]。然而, 柿叶提取物的质量分析方法主要是通过水解法测定槲皮素和山柰酚的总量作为质量控制的依据/标准^[7], 却未全面评测除槲皮素

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2019M662832)

作者简介: 郭海彪, 男, 博士, 高级工程师 Tel: (020)66282326

E-mail: 466612213@qq.com

*通信作者: 王德勤, 女, 硕士, 高级

工程师 Tel: 13924236361 E-mail: wdqhbh@163.com

和山柰酚以外的其他黄酮类成分。为了更好地表征柿叶提取物的黄酮类成分,建立系统的多成分多指标质量评价方式显得尤为重要。

中国药典 2010 年版一部收录了一测多评(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)法,该方法是利用中药有效成分的内在函数和比例关系计算,以样品中某一廉价易得的对照品为内标物,实现对多个成分的同时测定的分析方法^[8-11]。本实验室曾建立了柿叶提取物(脑心清流膏)及脑心清片中槲皮苷的含量测定方法^[12]。本研究首次将 QAMS 法应用于柿叶提取物中,选取槲皮素作为内标物,同时测定柿叶提取物中的金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、山柰酚的含量,以期更全面有效地控制柿叶提取物的质量,为其临床应用的质量保障提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Thermo UltiMate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司); 色谱柱 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 色谱柱 Agilent Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 色谱柱 Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 色谱柱 Waters XBridge-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); JA3003 电子分析天平(上海天平仪器厂); SB25-12DTD 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

金丝桃苷对照品(批号: MUST-16102605; 纯度为 99.76%)、异槲皮苷对照品(批号: MUST-17051005; 纯度为 99.74%)、槲皮苷对照品(批号: MUST-16120510; 纯度为 99.19%)、杨梅素对照品(批号: MUST-17022504; 纯度为 98.31%)、槲皮素对照品(批号: MUST-16111114; 纯度为 99.35%)均购于成都曼思特生物科技有限公司; 山柰酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号: 110861-201611; 纯度为 95.5%); 柿叶提取物(广州白云山和记黄埔中药有限公司,批号分别为 H16P006-1, H16P006-2, H16P006-3, K17P008-1, K17P009-2); 乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司); 甲醇(分析纯,广州化学试剂厂); 磷酸(分析纯,广州化学试剂厂),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取各对照品适量,置于 25 mL 量

瓶中,加甲醇定容至刻度线,摇匀,制成质量浓度分别为金丝桃苷 0.811 6 mg·mL⁻¹、异槲皮苷 0.709 2 mg·mL⁻¹、槲皮苷 0.782 0 mg·mL⁻¹、杨梅素 0.833 2 mg·mL⁻¹、槲皮素 0.759 2 mg·mL⁻¹、山柰酚 0.798 0 mg·mL⁻¹的混合对照品储备液。

分别精密吸取上述混合对照品储备液 10.0, 5.0, 3.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.1 mL,置于 25 mL 量瓶中,甲醇稀释定容至刻度线,摇匀,制得系列混合对照品溶液,序号分别为 1~7。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取柿叶提取物约 0.1 g,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声处理(250 W, 45 kHz)30 min,取出,放冷至室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1%磷酸水溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱:0~40 min, 93%→75% A; 40~60 min, 75%→50%A; 流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL,色谱图见图 1。

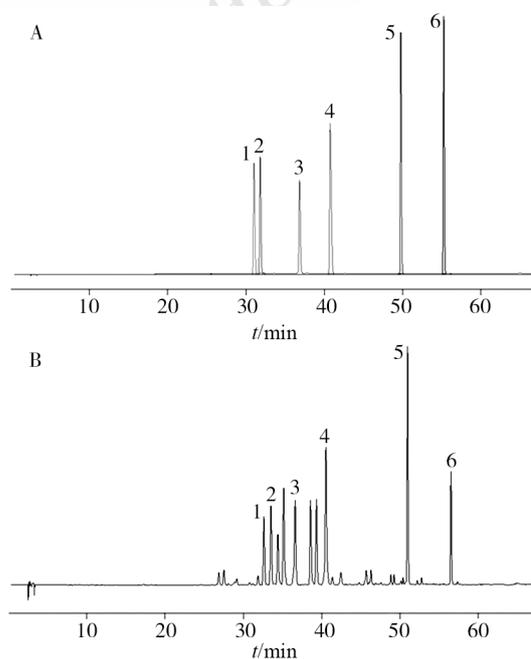


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; 1-金丝桃苷; 2-异槲皮苷; 3-槲皮苷; 4-杨梅素; 5-槲皮素; 6-山柰酚。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed standard solution; B-sample solution; 1-hyperoside; 2-isoquercitrin; 3-quercitrin; 4-myricetin; 5-quercetin; 6-kaempferol.

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察、检测限、定量限试验 分别精密吸取“2.1”项中的系列浓度的混合对照品溶液，进样 10 μL ，测定各对照品的峰面积。以各对照品进样量(X)对峰面积积分值(Y)进行线性回归处理，得金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚的回归方程、线性范围和相关系数。并以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)确定方法的检出限(limits of detection, LOD)和定量限(limits of quantification, LOQ)。结果表明，各对照品在一定浓度范围内均呈良好的线性关系，结果见表 1。

表 1 6 个成分回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Tab. 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges and limits of detection, limits of quantification of 6 components

成分	线性方程	R^2	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
金丝桃苷	$y=1\ 897.342x+8.593$	0.999 5	0.032 5~3.246 4	2.5	8.7
异槲皮苷	$y=2\ 214.358x+5.334$	0.999 5	0.028 4~2.836 8	2.1	7.9
槲皮苷	$y=1\ 665.189x+7.934$	0.999 4	0.031 3~3.128 0	1.9	5.5
杨梅素	$y=3\ 048.915x+0.068$	0.999 8	0.033 3~3.332 8	1.6	5.3
槲皮素	$y=4\ 027.466x+9.429$	0.999 7	0.030 4~3.036 8	2.9	9.7
山柰酚	$y=3\ 865.650x+11.858$	0.996 0	0.031 9~3.192 0	2.3	8.5

2.4.2 仪器精密度试验 取柿叶提取物供试品溶液(批号: H16P006-1)，在“2.3”项色谱条件下连续进样 6 次，记录金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚的峰面积，其 RSD 分别为 0.23%，0.18%，0.35%，1.54%，0.63%，0.60%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取柿叶提取物(批号: H16P006-1)，按“2.2”项下方法平行制备 6 份柿叶提取物供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件测定，记录金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚的峰面积，并计算出各成分的含量平均值(按干燥品计算)分别为 21.897 6, 23.355 3, 34.118 7, 3.486 8, 29.814 1, 14.398 1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，RSD 依次为 0.98%，0.56%，0.95%，1.51%，1.39%，1.16%，表明该方法的重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取柿叶提取物供试品溶液(批号: H16P006-1)，在室温下放置，分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 按“2.3”项下色谱条件进行测定。结果显示，金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚的峰面积 RSD 分别为 0.53%，0.20%，0.36%，1.56%，0.65%，0.92%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率 称取已测各指标成分量的柿叶提取物(批号: H16P006-1)约 0.05 g，精密称定，分别精密加入含有与样品等量的金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素和山柰酚的对照品溶液，按“2.2”项下方法制备加样回收率供试品溶液，平行制备 6 份，按“2.3”项下色谱条件测定 6 种成分的峰面积，计算各成分的平均加样回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收率考察结果($n=6$)

Tab. 2 Results of recovery tests($n=6$)

成分	样品 含量/mg	对照品 加入量/mg	测得 总量/mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
金 丝 桃 苷	1.125 9	1.216 7	2.318 3	98.00	100.43	2.13
	1.114 9	1.216 7	2.362 7	102.5		
	1.150 1	1.216 7	2.330 4	97.01		
	1.062 2	1.216 7	2.305 9	102.2		
	1.081 9	1.216 7	2.310 8	101.0		
	1.136 9	1.216 7	2.375 6	101.1		
异 槲 皮 苷	1.711 9	1.734 6	3.408 3	97.80	100.01	1.81
	1.695 1	1.734 6	3.430 6	100.5		
	1.748 6	1.734 6	3.480 3	99.83		
	1.614 9	1.734 6	3.317 6	98.16		
	1.645 0	1.734 6	3.397 1	101.1		
	1.728 6	1.734 6	3.519 2	103.3		
槲 皮 素	1.750 9	1.692 8	3.455 5	100.0	100.08	1.88
	1.733 8	1.692 8	3.409 2	98.97		
	1.788 5	1.692 8	3.545 3	103.8		
	1.651 7	1.692 8	3.316 2	98.33		
	1.682 5	1.692 8	3.380 2	100.9		
	1.768 0	1.692 8	3.434 0	98.42		
杨 梅 素	0.176 7	0.185 3	0.368 0	103.1	100.08	2.42
	0.175 0	0.185 3	0.356 1	97.75		
	0.180 5	0.185 3	0.371 5	103.5		
	0.166 7	0.185 3	0.350 5	99.17		
	0.169 8	0.185 3	0.363 0	104.3		
	0.178 5	0.185 3	0.362 6	99.35		
槲 皮 苷	1.541 5	1.519 4	3.071 0	100.7	99.35	1.40
	1.526 4	1.519 4	3.019 4	98.26		
	1.574 6	1.519 4	3.118 1	101.9		
	1.454 2	1.519 4	2.948 9	98.38		
	1.481 3	1.519 4	2.992 8	99.48		
	1.556 5	1.519 4	3.041 0	97.70		
山 柰 酚	0.742 5	0.758 4	1.486 2	98.06	100.51	1.91
	0.735 2	0.758 4	1.512 3	102.6		
	0.758 4	0.758 4	1.523 4	100.7		
	0.700 4	0.758 4	1.454 5	99.43		
	0.713 5	0.758 4	1.463 1	98.84		
	0.749 7	0.758 4	1.533 7	103.3		

2.4.6 相对校正因子的计算 取系列混合对照品溶液，分别进样 10 μL ，测定金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚的峰面积，以槲皮素为内标物，根据公式 $f_{km}=W_k \times A_m / (W_m \times A_k)$ (其中 W_k 为内标物的浓度， A_k 为内标物的峰面积， W_m 为其他组分 m 的浓度， A_m 为其他成分 m 的峰面积)^[9-10]，以槲皮素为内标物，分别计算其与金丝桃苷($m1$)、异槲皮苷($m2$)、槲皮苷($m3$)、杨梅素($m4$)、山柰酚($m5$)5 种成分的相对校正因子，结果见表 3。

表 3 相对校正因子的计算结果

Tab. 3 Calculation results of relative correction factor

系列浓度	f_{km1}	f_{km2}	f_{km3}	f_{km4}	f_{km5}
1	0.485 3	0.555 0	0.426 5	0.756 8	0.966 5
2	0.484 3	0.548 1	0.429 4	0.759 0	0.960 3
3	0.486 2	0.557 5	0.426 4	0.759 7	0.972 0
4	0.474 9	0.543 9	0.418 5	0.773 4	0.960 7
5	0.475 6	0.553 4	0.418 2	0.777 1	0.964 1
6	0.471 8	0.549 4	0.414 2	0.787 2	0.959 9
7	0.476 4	0.558 9	0.414 3	0.789 3	0.942 6
平均值	0.479 2	0.552 3	0.421 1	0.771 8	0.960 9
RSD/%	1.13	0.91	1.38	1.63	0.88

2.5 相对校正因子的耐用性考察

2.5.1 不同色谱柱和仪器对相对校正因子的影响

分别采用 2 种不同品牌的高效液相仪器 Agilent 1260 和 Thermo UltiMate 3000, 以及 5 种不同色谱柱 ①Agilent Eclipse Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), ②Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), ③Agilent Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), ④Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), ⑤Waters XBridge-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对各待测成分的相对校正因子的影响。结果显示金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、山柰酚与内标物槲皮苷之间的相对校正因子在不同的仪器和色谱柱下重现性良好, RSD 在 1.37%~2.84%, 表明上述不同的仪器和色谱柱对校正因子无明显影响。结果见表 4。

表 4 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 4 Effects of different instruments and columns on relative correction factor

仪器	色谱柱	f_{km1}	f_{km2}	f_{km3}	f_{km4}	f_{km5}
Agilent 1260	色谱柱①	0.479 2	0.552 3	0.421 1	0.771 8	0.960 9
	色谱柱②	0.463 3	0.544 7	0.405 8	0.756 0	0.953 6
	色谱柱③	0.461 3	0.568 0	0.404 3	0.780 2	0.968 0
	色谱柱④	0.469 6	0.539 0	0.407 4	0.766 2	0.959 7
	色谱柱⑤	0.475 3	0.559 0	0.411 2	0.768 7	0.952 2
Thermo UltiMate 3000	色谱柱①	0.482 4	0.566 8	0.421 4	0.720 3	0.979 3
	色谱柱②	0.491 0	0.589 0	0.436 0	0.743 4	0.992 3
	色谱柱③	0.486 5	0.586 1	0.423 2	0.728 6	0.987 3
	色谱柱④	0.476 7	0.557 8	0.418 8	0.724 3	0.978 3
	色谱柱⑤	0.480 1	0.572 2	0.419 6	0.728 8	0.975 9
平均值		0.476 5	0.562 8	0.416 9	0.748 8	0.970 7
RSD/%		1.90	2.75	2.22	2.84	1.37

2.5.2 不同柱温对相对校正因子的影响 采用 Agilent 1260 高效液相色谱系统和 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱, 考察了不同柱温(28, 30, 32 °C) 对相对校正因子的影响, 结果金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、山柰酚相对校正因子平均值

分别为 0.479 3, 0.554 6, 0.422 9, 0.773 5, 0.961 1; RSD 分别为 0.49%, 0.35%, 0.43%, 0.56%, 0.22%。表明柱温对相对校正因子无显著性影响。

2.5.3 不同流速对相对校正因子的影响 采用 Agilent 1260 高效液相色谱系统和 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱, 考察了不同流速(0.9, 1.0, 1.1 L·min⁻¹)对相对校正因子的影响, 结果金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、山柰酚相对校正因子平均值分别为 0.479 6, 0.552 9, 0.421 2, 0.772 3, 0.961 7; RSD 分别为 0.74%, 0.53%, 0.72%, 0.84%, 0.42%。表明流速对相对校正因子无显著性影响。

2.6 各待测成分色谱峰的定位

利用相对保留时间可以对待测成分的色谱峰进行定位, 即以各待测成分的色谱峰与槲皮素的相对保留时间比值来确定^[11]。以槲皮素为基准峰, 计算不同仪器和不同色谱柱条件下金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、山柰酚的色谱峰相对保留时间, 结果见表 5。

表 5 不同仪器和色谱柱对相对保留时间的影响

Tab. 5 Effects of different instruments and columns on relative retention time

仪器	色谱柱	相对保留时间				
		金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮苷	杨梅素	山柰酚
Agilent 1260	色谱柱①	0.638 1	0.655 8	0.754 9	0.829 6	1.108 3
	色谱柱②	0.637 3	0.655 9	0.757 7	0.834 0	1.109 4
	色谱柱③	0.588 7	0.606 4	0.707 0	0.779 9	1.126 1
	色谱柱④	0.631 4	0.644 3	0.748 2	0.821 9	1.107 6
	色谱柱⑤	0.622 7	0.638 5	0.735 9	0.819 4	1.104 1
Thermo UltiMate 3000	色谱柱①	0.614 3	0.631 1	0.726 2	0.799 8	1.116 7
	色谱柱②	0.602 7	0.619 2	0.713 8	0.793 5	1.119 7
	色谱柱③	0.590 3	0.607 2	0.704 5	0.778 2	1.131 0
	色谱柱④	0.604 4	0.625 1	0.722 0	0.796 5	1.116 6
	色谱柱⑤	0.601 7	0.618 9	0.711 3	0.787 4	1.115 9
平均值		0.612 0	0.630 2	0.728 2	0.804 0	1.115 5
RSD/%		2.86	2.73	2.60	2.43	0.73

2.7 QAMS 法与外标法测定结果比较

取 5 个不同批次的柿叶提取物, 按“2.2”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, 分别采用 QAMS 法和外标法对样品中的 6 种黄酮类成分进行含量测定(含量按柿叶提取物的干燥品计算), 结果见表 6。结果显示, QAMS 和外标法的结果没有显著性差异, 相对偏差<5%, 表明建立的 QAMS 法的具有良好的可信度, 可用于标准的起草和制定。

表 6 QAMS 与 ESM 法含量测定结果的比较(n=2)

Tab. 6 Comparison of content determination results between QAMS and ESM(n=2)

批号	槲皮/ mg·g ⁻¹	金丝桃苷			异槲皮苷			槲皮苷			杨梅素			山柰酚		
		外标法/ mg·g ⁻¹	QAMS/ mg·g ⁻¹	相对 偏差/%	外标法/ mg·g ⁻¹	QAMS/ mg·g ⁻¹	相对偏 差/%									
H16P006-1	30.107	21.991	21.786	-0.93	23.435	23.364	-0.30	34.196	33.700	-1.45	3.452	3.371	-2.33	14.502	14.602	0.69
H16P006-2	27.007	21.031	20.825	-0.98	20.759	20.700	-0.29	30.411	29.976	-1.43	3.149	3.075	-2.35	13.043	13.137	0.72
H16P006-3	29.803	21.541	21.328	-0.98	23.933	23.853	-0.33	35.183	34.651	-1.51	3.431	3.352	-2.30	14.134	14.224	0.64
K17P008-1	12.939	17.577	17.406	-0.97	44.364	44.228	-0.31	44.151	43.505	-1.46	1.697	1.657	-2.33	16.091	16.201	0.68
K17P009-2	13.794	16.182	16.027	-0.95	39.206	39.098	-0.27	40.206	39.602	-1.50	1.441	1.409	-2.23	17.823	17.949	0.70

3 讨论

中国药典 2015 年版中对柿叶提取物总黄酮含量按以供试品酸水解后槲皮素和山柰酚的量计^[5], 未对其他黄酮类成分进行全面的分析, 在某种程度上易造成其药理和临床研究的片面性。本实验不对供试品进行酸水解处理, 首先采用 DAD 检测器对混合对照品溶液进行全波长扫描, 发现金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷的最大吸收波长为 254 nm 和 355 nm, 杨梅素的最大吸收波长为 254 nm 和 375 nm, 槲皮素的最大吸收波长为 254 nm 和 370 nm, 山柰酚的最大吸收波长为 264 nm 和 365 nm。考虑到这 6 个待测成分在 360 nm 附近均有较大的吸收, 干扰少, 且峰形良好, 谱图基线平稳, 因此选择 360 nm 作为检测波长。本实验对提取溶剂(50%, 75%, 100%甲醇)、溶剂体积(20, 30, 40 mL)以及超声提取时间(20, 30, 40 min)进行比较, 发现 20 mL 甲醇超声提取 30 min 时, 各成分提取率较高。

综上所述, 本实验以槲皮素作为内标物, 建立 QAMS 法测定柿叶提取物中 6 种黄酮类成分的含量, 并对相对校正因子的耐用性进行了考察, 以实现多指标质量评价的需求。同时, 还比较了该方法与内标法所得结果, 该方法发现两者无显著差异。本研究建立的 QAMS 法不仅便捷, 而且具有较高的重现性、稳定性和可信性, 为柿叶提取物的质量标准提升提供参考依据。

REFERENCES

[1] ZHANG S H, WANG Y Z, DUAN F P, et al. Study on chemical constituents of flavonoids from persimmon leaves[J]. Tianjin J

Tradit Chin Med(天津中医药), 2014, 31(8): 501-503.
 [2] ZHOU X T, WANG L L, HAN L, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Diospyros kaki* leaves[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(21): 3195-3203.
 [3] LI C Y, BEI W J, LIU C X, et al. Advances in studies on prevention and treatment for cerebral arteriosclerosis of Naoxinqing Pellet [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2010, 33(4): 296-301.
 [4] YUAN X P, WANG Y Y. Pharmacological effects of flavonoids in persimmon leaves and their application in preparation[J]. Sci Technol Vis(科技视界), 2018(36): 80-81.
 [5] 马新博, 宫汝飞. 柿叶黄酮药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2012, 40(4): 130-132.
 [6] 中国药典. 一部[S]. 2015.
 [7] BEI W J, LUO J, WU A L, et al. Determination of quercetin and kaempferol in *Diospyros kaki* leaf extract by HPLC[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, (7): 1014-1015.
 [8] WANG Z M, GAO H M, FU X T, et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(23): 1925-1928.
 [9] HUANG R M, LIU W R, LIU C H, et al. Determination of total lactones content in Ginkgo Folium by QAMS[J]. Pharm Today, 2016, 26(4): 231-234.
 [10] ZHAO Y Y, GUO H Z, CHEN Y G, et al. A comparative study and suggestion on relative correction factor produced by different methods in quantitative analysis of multi-components[J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2014, 15(4): 245-251.
 [11] LUO Z L, QIU F, WEI R W, et al. Application of relative correction factor in multi-index determination of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 43(7): 1448-1452.
 [12] SU S Y, GUO H B, LI C Y, et al. Content determination of quercitrin in naoxinqing crude drug and tablets by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(12): 1874-1877.

收稿日期: 2020-02-18
(本文责编: 李艳芳)