

[质 量]

一测多评法同时测定脑心清片中 6 种黄酮

苏诗韵, 郭海彪*, 李楚源, 王德勤, 李雯珊, 朱东海
(广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 建立一测多评法同时测定脑心清片(柿叶提取物)中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 360 nm; 柱温 30 ℃。以槲皮素为内标, 计算金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、山柰酚的相对校正因子, 并测定其含有量。**结果** 6 种黄酮在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999\ 4$), 平均加样回收率 99.59% ~ 101.16%, RSD 1.28% ~ 2.54%, 一测多评法所得结果与外标法接近。**结论** 该方法简便、准确、可靠, 可用于脑心清片的质量控制。

关键词: 脑心清片; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 槲皮苷; 杨梅素; 槲皮素; 山柰酚; 一测多评

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)11-2441-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.016

Simultaneous determination of six flavonoids in Naoxingqing Tablets by QAMS

SU Shi-yun, GUO Hai-biao*, LI Chu-yuan, WANG De-qin, LI Wen-shan, ZHU Dong-hai
(Guangzhou Baiyun Mountain Hutchison Whampoa Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method for the simultaneous content determination of hyperoside, isoquercitrin, quercitrin, myricetin, quercetin and kaempferol in Naoxingqing Tablets (extract from the leaves of *Diospyros kaki* Thunb.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 360 nm. With quercetin as an internal standard, the relative correction factors of hyperoside, isoquercitrin, quercitrin, myricetin and kaempferol were calculated, after which the content determination was made. **RESULTS** Six flavonoids showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 4$), whose average recoveries were 99.59% – 101.16% with the RSDs of 1.28% – 2.54%. The results obtained by QAMS approximated those obtained by external standard method. **CONCLUSION** This simple, accurate and reliable method can be used for the quality control of Naoxingqing Tablets.

KEY WORDS: Naoxingqing Tablets; hyperoside; isoquercitrin; quercitrin; myricetin; quercetin; kaempferol; quantitative analysis of multi-components by single-marker

中药及其制剂中的有效成分复杂多样, 仅利用单一成分难以对其质量进行全面准确的评价和控制, 故多成分、多指标质量评价方式成为必然趋势^[1]。传统的多指标质量评价模式需要有相应的多个对照品, 但部分对照品因不稳定、难以分离、价格昂贵等问题限制了在实际生产、科研和监管领域中的应用和普及^[2]。一测多评法通过只测定 1 种成分(相应对照品价廉易得), 并利用中药有效成分的内在函数和比例关系进行计算, 从而实现多种成分(相应对照品价高难得)的同步测定, 是 1

收稿日期: 2018-06-12
基金项目: 广东省科技计划项目(2011A080502005)
作者简介: 苏诗韵(1991—), 女, 硕士, 药师, 从事中药制剂质量与工艺研究。Tel: (020) 66282330, E-mail: so_ssy@126.com
* 通信作者: 郭海彪(1988—), 男, 博士, 主管药师, 研究方向为心脑血管药理学与中成药二次开发。E-mail: taylorghb@qq.com

种符合中药特点的多指标质量评价新模式^[3], 而且与同样作为多指标质量评价手段的中药指纹图谱相比, 该方法的研究思路侧重从量上阐明主要成分或药效成分间的相互关系, 在指纹图谱整体控制的基础上进一步明确个别成分的量, 从而弥补了中药指纹图谱技术模糊性的缺陷^[4]。目前, 一测多评法已广泛应用于中药质量控制中, 继 2010 年版《中国药典》^[5] 中首次收录了一测多评法测定黄连中多种生物碱成分的含有量后, 2015 年版又新增 8 个使用该方法的品种, 并将其将应用扩展至提取物、制剂的多指标质量控制, 是该版药典重点推广的技术之一^[6]。

柿叶为柿科植物柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的叶, 具有清肺止咳、止渴生津、凉血止血等多种功效^[7], 主要含有黄酮、三萜、酚酸类化合物, 其中黄酮苷是其主要药效成分^[8]。现代药理研究证实, 柿叶黄酮具有保护心脑血管系统、止血、抗氧化、降血糖、降血脂、降血压、抑制特异性皮炎、增强免疫、抗菌、抗癌等多种药理作用, 临床应用价值高^[9], 而且该成分易于工业化提取制备, 可为其开发利用提供良好的基础^[10]。

脑心清片是以柿叶提取物为原料加工制成的制剂, 具有活血化瘀、通络的功效, 用于治疗脉络淤阻、眩晕头痛、肢体麻木、胸痹心痛、胸中憋闷、心悸气短及冠心病、脑动脉硬化症^[11]。但现行《中国药典》中其质量控制手段仅采用 HPLC 法测定经盐酸水解后的黄酮苷元类成分槲皮素、山柰酚总含有量, 不仅操作繁复, 而且难以全面反映和评价黄酮苷和苷元含有量, 同时也无法测定苷元结构与槲皮素、山柰酚不同的成分含有量。虽然前期也有文献报道脑心清片中多种有效成分含有量同时测定的方法^[12], 但不仅需要同时使用多个相应对照品, 而且所采用的高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS/MS) 法在实际生产和质量控制中更加难以广泛普及和应用。因此, 本实验通过一测多评法同时测定脑心清片中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚的含有量, 为该制剂的质量控制和评价提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪, 配置 G1311C 型四元泵、G1329B 型进样器、G1316A 型柱温箱、G1315D 型二极管阵列检测器 (美国安捷伦公司); ThermoUltiMate 3000 高效液相色谱仪, 配置 LPG-3400SDN 型四元泵、WPS-2442

3000SL 型进样器、TCC-3000RS 型柱温箱、DAD-3000 型检测器 (美国赛默飞公司); 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)。

1.2 试药 金丝桃苷 (批号 MUST-16102605, 含有量 99.76%)、异槲皮苷 (批号 MUST-17051005, 含有量 99.74%)、槲皮苷 (批号 MUST-16120510, 含有量 99.19%)、杨梅素 (批号 MUST-17022504, 含有量 98.31%)、槲皮素 (批号 MUST-16111114, 含有量 99.35%) 对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司; 山柰酚 (批号 110861-201611, 含有量 95.5%) 对照品购自中国食品药品检定研究院。柿叶乙酸乙酯提取物 (批号 H16P006-1、H16P006-2、H16P006-3) 由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供。乙腈为色谱纯 (美国 Tedia 公司); 其他试剂均为分析纯 (广州化学试剂厂); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) - 0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 40 min, 7% ~ 25% A; 40 ~ 60 min, 25% ~ 50% A); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 360 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.811 6、0.709 2、0.782 0、0.833 2、0.759 2、0.798 0 mg/mL 的对照品贮备液, 分别精密吸取 5.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.1 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

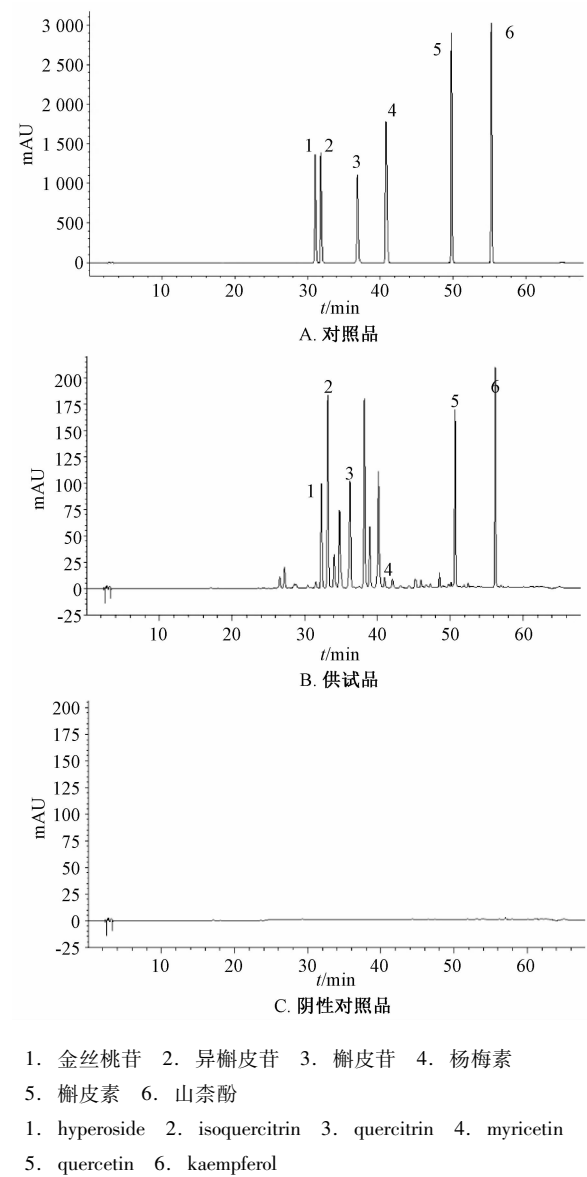
2.3 供试品溶液制备 取片剂 10 片, 除去包衣, 研细, 精密称取约 1 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声 (250 W、45 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 甲醇补足

2.4 阴性对照品溶液制备 按照处方及工艺, 制备不含柿叶提取物的阴性对照品, 按“2.3”项下方法制备, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 取对照品、供试品、阴性对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。由图可知, 6 种成分色谱峰分离度良好, 阴性对照在相同保留时间处未见相应色谱峰, 表明

阴性无干扰，方法专属性良好。



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
1. hyperoside 2. isoquercitrin 3. quercitrin 4. myricetin
5. quercetin 6. kaempferol

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.5.2 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液各 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/μg
金丝桃苷	$Y=1\,897.342X+8.593$	0.999 5	0.032 5~1.623 2
异槲皮苷	$Y=2\,214.358X+5.334$	0.999 5	0.028 4~1.418 4
槲皮苷	$Y=1\,665.189X+7.934$	0.999 4	0.031 3~1.564 0
杨梅素	$Y=3\,048.915X+0.068$	0.999 8	0.033 3~1.666 4
槲皮素	$Y=4\,027.466X+9.429$	0.999 7	0.030 4~1.518 4
山柰酚	$Y=3\,865.650X+11.858$	0.999 6	0.031 9~1.596 0

2.5.3 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液（批号 C17A003），在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚峰面积 RSD 分别为 0.77%、0.84%、0.66%、1.79%、0.45%、0.61%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取同一样品（批号 C17A003），按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚含有量 RSD 分别为 1.51%、1.38%、1.44%、1.81%、1.13%、1.26%，表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液（批号 C17A003），于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下测定，测得金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚峰面积 RSD 分别为 1.06%、0.94%、0.71%、1.86%、0.46%、0.63%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取含有量已知的同一样品（批号 C17A003）约 0.5 g，共 6 份，加入等量对照品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚平均加样回收率分别为 100.51%、100.26%、100.16%、99.59%、100.28%、100.25%，RSD 分别为 1.61%、1.47%、1.45%、2.54%、1.28%、1.70%。

2.6 相对校正因子的计算 取“2.2”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定，以槲皮素为内标，计算其他 5 种成分的相对校正因子^[13]。结果见表 2。

表 2 各成分相对校正因子

Tab. 2 Relative correction factors of various constituents

编号	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮苷	杨梅素	山柰酚
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

2.7 耐用性考察

2.7.1 不同仪器、色谱柱 考察 Agilent 1260、Thermo UltiMate 3000 色谱仪，以及 Agilent Eclipse Plus C₁₈、Agilent Eclipse XDB-C₁₈、Agilent Extend-

C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）对相对校正因子的影响，结果见表 3。由表可知，不同仪器、色谱柱对相对校正因子无明显影响，RSD 为 1.43% ~2.88%。

表 3 不同仪器、色谱柱对相对校正因子的影响

仪器		相对校正因子				
		金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮苷	杨梅素	山柰酚
Agilent 1260	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.479 2	0.552 3	0.421 1	0.771 8	0.960 9
	Agilent Eclipse XDB-C ₁₈	0.463 3	0.544 7	0.405 8	0.756 0	0.953 6
	Agilent Extend-C ₁₈	0.461 3	0.561 8	0.404 3	0.780 2	0.968 0
Thermo UltiMate 3000	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.482 4	0.566 8	0.421 4	0.720 3	0.979 3
	Agilent Eclipse XDB-C ₁₈	0.491 0	0.589 0	0.436 0	0.743 4	0.992 3
	Agilent Extend-C ₁₈	0.486 5	0.586 1	0.423 2	0.728 6	0.987 3
	平均值	0.477 3	0.566 8	0.418 6	0.750 1	0.973 6
	RSD/%	2.35	2.87	2.59	2.88	1.43

2.7.2 柱温 考察柱温 28、30、32 ℃对相对校正因子的影响，结果见表 4。由表可知，不同柱温对相对校正因子无明显影响，RSD 为 0.22% ~0.56%。

表 4 不同柱温对相对校正因子的影响

Tab. 4 Effects of different column temperatures on relative correction factors					
柱温/℃	相对校正因子				
	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮苷	杨梅素	山柰酚
28	0.476 5	0.554 3	0.422 1	0.769 2	0.958 7
30	0.479 2	0.552 3	0.421 1	0.771 8	0.960 9
32	0.482 3	0.557 1	0.425 4	0.779 4	0.963 8
平均值	0.479 3	0.554 6	0.422 9	0.773 5	0.961 1
RSD/%	0.49	0.35	0.43	0.56	0.22

2.7.3 体积流量 考察体积流量 0.9、1.0、1.1 mL/min对相对校正因子的影响，结果见表 5。由表可知，不同体积流量对相对校正因子无明显影

响，RSD 为 0.42% ~0.84%。

表 5 不同体积流量对相对校正因子的影响

体积流量/ (mL·min ⁻¹)	相对校正因子				
	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮苷	杨梅素	山柰酚
0.9	0.475 4	0.549 6	0.417 5	0.764 6	0.957 3
1.0	0.479 2	0.552 3	0.421 1	0.771 8	0.960 9
1.1	0.484 1	0.556 7	0.424 9	0.780 5	0.967 0
平均值	0.479 6	0.552 9	0.421 2	0.772 3	0.961 7
RSD/%	0.74	0.53	0.72	0.84	0.42

2.8 待测成分色谱峰定位^[14] 取“2.3”项下供试品溶液，分别采用 2 种色谱仪和 3 种色谱柱计算相对保留时间，结果见表 6。由表可知，不同仪器、色谱柱对相对保留时间无明显影响，RSD 为 0.74% ~3.29%。

表 6 不同仪器、色谱柱对相对保留时间的影响

仪器		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	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.638 1	0.655 8	0.754 9	0.829 6	1.108 3
	Agilent Eclipse XDB-C ₁₈	0.637 3	0.655 9	0.757 7	0.834 0	1.109 4
	Agilent Extend-C ₁₈	0.588 7	0.606 4	0.707 0	0.779 9	1.126 1
Thermo UltiMate 3000	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.614 3	0.631 1	0.726 2	0.799 8	1.116 7
	Agilent Eclipse XDB-C ₁₈	0.602 7	0.619 2	0.713 8	0.793 5	1.119 7
	Agilent Extend-C ₁₈	0.590 3	0.607 2	0.704 5	0.778 2	1.131 0
	平均值	0.611 9	0.629 3	0.727 4	0.802 5	1.118 5
	RSD/%	3.29	3.26	2.97	2.75	0.74

2.9 样品含有量测定 取 6 批样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，分别采用一测多评法和外标法计算含有量，结果见表 7。由表可知，2 种方法所得结果无显著性差异。

3 讨论

3.1 检测波长选择 本实验采用 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、槲皮苷最大吸收波长为 254、355 nm，杨梅素为 254、375 nm，槲皮素为 254、370 nm，山

表 7 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 7 Results of content determination of various constituents (mg/g)

批号	槲皮素	金丝桃苷		异槲皮苷		槲皮苷		杨梅素		山柰酚	
		一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法
C17A003	0.954 2	1.547 0	1.538 7	2.366 7	2.372 4	3.228 4	3.111 6	0.120 4	0.104 9	1.201 5	1.213 1
C17A004	1.091 2	1.588 3	1.564 2	2.504 0	2.485 5	3.279 1	3.214 1	0.138 7	0.135 4	1.458 6	1.456 8
D17A006	1.470 3	1.568 1	1.546 5	2.244 8	2.231 8	2.894 4	2.842 2	0.152 5	0.149 0	1.831 3	1.829 6
E17A003	1.637 9	1.407 9	1.390 2	2.063 7	2.053 2	2.668 9	2.622 8	0.157 9	0.154 3	2.076 0	2.074 0
G17A001	1.682 4	1.322 2	1.306 3	1.804 5	1.796 1	2.567 6	2.523 9	0.135 0	0.132 1	2.326 9	2.323 9
G17A002	1.782 0	1.219 8	1.206 3	1.674 7	1.667 7	2.419 1	2.379 1	0.143 1	0.139 9	2.525 4	2.521 9

柰酚为 264、365 nm。由于这 6 种成分在 360 nm 波长处均有较大吸收，干扰较少，而且峰形良好，基线平稳，故选择其作为检测波长。

3.2 供试品溶液制备方法选择 本实验对提取溶剂（50%、75%、100% 甲醇）、用量（15、25、35 mL）、超声时间（20、30、40 min）进行比较，发现 20 mL 甲醇超声 30 min 时，各成分提取率较高，故选择该方法制备供试品溶液。

4 结论

本实验以槲皮素为内标，建立一测多评法同时测定脑心清片中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、山柰酚 6 种黄酮的含有量，并对耐用性进行了考察，以实现多指标质量评价的需求。同时，还比较了该方法与外标法所得结果，发现两者无显著差异。综上所述，该方法不仅操作简便，而且具有较高的重复性、稳定性和可行性，可为脑心清片质量评价提供参考依据。

参考文献：

[1] 王智民，钱忠直，张启伟，等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志，2011，36(6)：657-658.

[2] 王 曼，王 敏，张 梅. 一测多评法在中药材及制剂质量控制中的研究进展[J]. 中药与临床，2016，7(6)：59-63.

[3] 王智民，高慧敏，付雪涛，等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志，2006，31(23)：

1925-1928.

[4] 陆兔林，石上梅，蔡宝昌，等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展[J]. 中草药，2012，43(12)：2525-2529.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2010 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2010.

[6] 杨 洋，黄良永，朱美玲，等. 一测多评法在中国药典 2015 年版中的应用[J]. 中南药学，2017，15(12)：1738-1741.

[7] 李 娜，周志宏. 柿的药学研究概况[J]. 中国民族民间医药，2015，24(16)：40-43.

[8] 周鑫堂，王丽莉，韩 璐，等. 柿叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药，2014，45(21)：3195-3203.

[9] 曹 珊，张小莉，白 明，等. 柿叶总黄酮药理作用研究及其临床应用探讨[J]. 中医学报，2012，27(8)：987-989.

[10] 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.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.

[12] 张梦雨，徐 洋，宋冠杉，等. 高效液相色谱-质谱联用法同时测定脑心清原料药浸膏及其片剂中的 8 种有效成分[J]. 色谱，2016，34(8)：773-777.

[13] 罗祖良，仇 峰，韦日伟，等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展[J]. 中草药，2012，43(7)：1448-1452.

[14] 赵一懿，郭洪祝，陈有根，等. 中药多组分含量测定中相对校正因子计算方法的比较与建议[J]. 中国药品标准，2014，15(4)：245-251.