

指纹图谱与一测多评法相结合评价荔枝多酚提取物

胡雪艳, 李焕清, 邓红*, 张蜀, 杜枚倩, 黄德浩

广东药科大学 广东省药物新剂型重点实验室, 广东 广州 510006

摘要: 目的 采用指纹图谱与一测多评 (QAMS) 结合的方法评价荔枝多酚提取物, 并测定提取物中 4 种多酚类成分。方法 采用 RP-UPLC 法测定 22 批荔枝多酚提取物, 建立指纹图谱的共有模式。以表儿茶素为内参物, 建立原花青素 A2、原花青素 B2、表儿茶素-(4 β →8,2 β →O→7)-表儿茶素-(4 β →8)-表儿茶素 (PC-C) 的相对校正因子 (f), 并测定各成分量, 实现 QAMS。同时比较 QAMS 和外标法测定 4 种多酚类成分量测得值的差异, 验证 QAMS 的可行性及其准确性。结果 22 批荔枝多酚提取物特征指纹图谱标定了 19 个共有峰, 指认了其中 9 个共有峰, 即 4 个已知主成分 6 号峰 (原花青素 B2)、8 号峰 (表儿茶素)、9 号峰 (PC-C)、15 号峰 (原花青素 A2), 3 个 A 型原花青素三聚体 (12、16、17 号峰), 1 个 A 型原花青素二聚体 (19 号峰) 和 1 个 B 型原花青素二聚体 (14 号峰); 22 批荔枝多酚提取物相似度大于 0.9, 其中 4 个主成分的 QAMS 计算值与外标法实测值间无显著差异 ($P>0.25$)。结论 指纹图谱与 QAMS 结合的质控模式准确可行, 可为全面合理评价荔枝多酚提取物的质量提供参考。

关键词: 指纹图谱; 一测多评法; 质量控制; 荔枝多酚; 提取物; UPLC; 多酚; 表儿茶素; 原花青素 A2; 原花青素 B2; 表儿茶素-(4 β →8,2 β →O→7)-表儿茶素-(4 β →8)-表儿茶素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)03-0490-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.012

Combinational quality control method of polyphenolic extract in *Litchi chinensis* based on fingerprint and QAMS

HU Xue-yan, LI Huan-qing, DENG Hong, ZHANG Shu, DU Mei-qian, HUANG De-hao

Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To evaluate the polyphenol extracted from *Litchi chinensis* and quantify the content of four kinds of polyphenol therein, the combination of fingerprint and quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) was used. **Methods** A total of 22 batches of extract from *Litchi chinensis* were assayed by RP-UPLC to establish a common mode of fingerprints. For achieving QAMS, a method was developed by selecting epicatechin as internal reference and the relative correction factor of the three components, procyanidin A2, procyanidin B2, and epicatechin-(4 β →8,2 β →O→7)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin (PC-C), to determine their contents. The feasibility and accuracy of QAMS were evaluated by comparing the contents of four polyphenols determined with two different methods, QAMS and external standard method. **Results** Nineteen common peaks were identified in the characteristic fingerprint, nine components, including the known principal components, procyanidine B2 (peak 6), epicatechin (peak 8), PC-C (peak 9), procyanidine A2 (peak 15), three trimers of procyanidine type A (peaks 12, 16, and 17), a dimer of procyanidine type A (peak 19) and a dimer of procyanidine type B (peak 14), were verified in 22 batches of *Litchi chinensis* extract. Good similarities with correlation coefficients higher than 0.9 were found in 22 batches fingerprints. There was no significant difference between calculated value and detected value of the four ingredients in 22 batches, by QAMS and external standard method. **Conclusion** The results showed that the combined method of fingerprint and QAMS for quality control is accurate and feasible and provide reference method to evaluate the quality of extracts from *Litchi chinensis*.

Key words: fingerprint; QAMS; quality control; *Litchi chinensis* polyphenolic; extract; UPLC; polyphenol; epicatechin; procyanidin A2; procyanidin B2; epicatechin-(4 β →8,2 β →O→7)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 广东省科技计划项目 (2013B021800090)

作者简介: 胡雪艳 (1990—), 女, 在读硕士生。E-mail: 674020515@qq.com

*通信作者 邓红 (1968—), 女, 教授级高级工程师。E-mail: dengh361@sohu.com

中药是多组分的组合体, 中药质量控制应采用多指标、多手段等方法进行综合性评价。中药指纹图谱能全面体现中药成分的整体性与稳定性^[1-3], 并体现种属间的共有性图谱片段; 一测多评法(QAMS)以样品中某一典型组分为内标, 建立与其他组分之间的相对校正因子(f), 并通过 f 计算其他组分的量^[4-7], 是《中国药典》2015 年版品种修订中重点推广技术。QAMS 常应用于对照品难分离、单体不稳定或价格昂贵的中药质量控制^[8]。指纹图谱与 QAMS 相结合的方法全面、科学地评价中药的质量, 提高了中药的稳定性和一致性^[8-9]。近年来, 国内外也有文献报道将 2 种方法结合用于中药的质量控制与定量测定^[8-11]。多酚类成分含有活性羟基, 有很强的抗氧化能力。具有抑菌^[12-14]、抗氧化^[15-16]、抗感染^[17]、抗衰老^[18]、抗肿瘤^[19-20]和保护心脏^[16,21-24]等作用。荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 为无患子科(Sapindaceae)荔枝属 *Litchi* Sonn. 南方常青植物, 荔枝极具开发价值。古有记载, 荔枝根可

行气止痛、固肾止涩; 树皮可舒肝解郁、祛风健胃; 树枝可治虚喘; 叶可解暑消滞、收湿敛疮; 花可治喉痹肿痛; 果壳可治血崩; 果核则有行气散结、祛寒止痛之功效^[25]。本课题组前期得到的荔枝多酚提取物^[26], 经过分离、分析和鉴定, 已经鉴定出 4 个化合物的结构, 分别为表儿茶素、原花青素 A2、原花青素 B2 和表儿茶素-(4 β →8,2 β →O→7)-表儿茶素-(4 β →8)-表儿茶素(以下简称 PC-C)。采用指纹图谱对荔枝多酚提取物进行整体评价, 并采用 QAMS 法对多酚提取物中单个组分进行定量测定, 为荔枝多酚的质量控制提供技术支持。

1 仪器与材料

Acquity UPLC H-Class 液相色谱仪, 检测器为 PDA 及 QDA, 工作站为 Empower 3, 美国 Waters; CP225D 电子分析天平, 德国 Sartorius; Acquity UPLC[®] HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱。共收集 22 批荔枝不同部位、不同采收期的原材料, 见表 1。其中共获得 5 个成熟期的荔枝皮。取

表 1 22 批荔枝原材料
Table 1 22 Batches of raw materials of *Litchi chinensis*

批号	外观	部位	产地
20140424-1	形成果实后第 1 次落果, 花生大小、墨绿, 第 1 次收集	未成熟皮	广东电白
20140424-2	形成果实后第 1 次落果, 花生大小、墨绿, 第 2 次收集	未成熟皮	广东电白
20140504	第 2 次落果, 成人拇指大小、墨绿, 第 1 次收集	未成熟皮	广东电白
20140507	第 2 次落果, 成人拇指大小、墨绿, 第 2 次收集	未成熟皮	广东电白
20140521	第 3 次落果, 果实基本定型, 绿色, 第 1 次收集	未成熟皮	广东电白
20140525-1	第 3 次落果, 果实基本定型、绿色, 第 2 次收集	未成熟皮	广东电白
20140601	第 3 次落果, 果实基本定型、绿色, 第 3 次收集	未成熟皮	广东电白
20150420-1	15 年形成果实后第 1 次落果, 花生大小、墨绿	未成熟皮	广东电白
20140525-2	成熟初期, 开始收获, 鲜红, 第 1 次收集	成熟皮	广东电白
20140605	成熟初期, 开始收获, 鲜红, 第 2 次收集	成熟皮	广东电白
20140620	成熟后期, 暗红, 第 1 次收集	成熟皮	广东电白
20140622	成熟后期, 暗红, 第 2 次收集	成熟皮	广东电白
20150420-2	浅黄色	未成熟核	广东电白
20150530	红褐色	成熟核	广东电白
20150420-3	墨绿	生理落果	广东电白
20150316-2	浅绿色	嫩枝	广东番禺
20151021-1	红褐色	成熟枝	广东番禺
20151021-2	棕褐色	老枝	广东番禺
20150316-1	荔枝成熟前新生嫩叶, 亮红棕色	嫩叶 A	广东番禺
20150529	绿色	成熟叶	广东番禺
20151012	荔枝成熟后新生嫩叶, 亮红棕色	嫩叶 B	广东番禺
20150325	浅绿色	花	广东番禺

原材料适量,用 68%乙醇按液料比 20:1、59℃回流提取 93 min,共 2 次。合并滤液,减压浓缩至无醇味,AB-8 大孔吸附树脂吸附,收集 65%乙醇洗脱液,43℃减压浓缩,冷冻干燥,即得 22 批多酚提取物,以原材料采集日期作为批号。荔枝生长过程中,荔枝形成果实但未成熟会出现 3 次大面积生理落果,未成熟核和未成熟皮由生理落果剥离获得。

表儿茶素对照品,质量分数 $\geq 98\%$,批号 878-200102,中国食品药品检定研究院;原花青素 A2、原花青素 B2、PC-C,从提取物中分离制备所得,经 UV、IR、ESI-MS²、NMR 谱确证,质量分数均 $\geq 98\%$ 。甲醇、乙腈,色谱纯,德国 Merck KGaA;甲酸,色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;液相用蒸馏水,屈臣氏;其他用水为去离子水,其他化学试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Acquity UPLC[®] HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱;流动相为乙腈-1%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~9 min, 8%~13%乙腈;9~10.5 min, 13%~15%乙腈;10.5~13 min, 15%~18%乙腈;13~15 min, 18%~22%乙腈;15~17 min, 22%~50%乙腈;17~17.5 min, 50%~8%乙腈;17.5~21 min, 8%乙腈;检测波长:光谱扫描范围 200~800 nm,检测波长为 280 nm;体积流量 0.35 mL/min;柱温 35℃;进样量 3 μ L。

2.1.2 质谱条件 电离模式 ESI⁺;正极性毛细管电压 1.5 kV;负极性毛细管电压 0.8 kV;探头温度

270℃;锥孔电压 30 V;采样速率 5 Hz;MS 扫描范围 m/z 100.00~1 100.00。

2.2 溶液配制

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取原花青素 B2 15 mg,置 20 mL 量瓶,用 30%甲醇溶解并稀释至刻度,即得原花青素 B2 对照品储备液。

分别取表儿茶素、原花青素 A2、PC-C 约 30、25、12 mg,精密称定,置同一 100 mL 量瓶中,加入原花青素 B2 对照品储备液 2 mL,用 30%甲醇溶解并稀释至刻度,即得混合对照品储备液。

精密吸取混合对照品储备液 5 mL,置 10 mL 量瓶,30%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取荔枝多酚提取物约 100 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶,30%甲醇溶解并定容至刻度,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 取混合对照品贮备液定量稀释制成分别含表儿茶素 30、60、90、150、180、240、300 μ g/mL,原花青素 B2 3、6、9、15、18、24、30 μ g/mL,原花青素 A2 25、50、75、125、150、200、250 μ g/mL,PC-C 12、24、36、60、72、96、120 μ g/mL 的系列混合对照品溶液,取上述系列溶液,按“2.1”项色谱条件进样分析,以质量浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,分别得各对照品的标准曲线及回归方程 L_1 : $A=kC+b$ 。将所得的标准曲线截距校正为 0 后,得曲线回归方程 L_2 : $A=kC$ 。各对照品校正前后曲线回归方程及线性范围见表 2。

表 2 线性回归方程

Table 2 Linear regression equations

对照品	回归方程 L_1	回归方程 L_2	线性范围/ng
表儿茶素	$A=6\ 175.0\ C-4\ 252.4$, $r=0.999\ 8$	$A=6\ 154.0\ C$, $r=0.999\ 8$	88.956~889.560
原花青素 B2	$A=6\ 085.6\ C-246.43$, $r=0.999\ 8$	$A=6\ 072.4\ C$, $r=0.999\ 8$	8.202~82.020
原花青素 A2	$A=6\ 560.4\ C-3\ 541.7$, $r=0.999\ 8$	$A=6\ 538.7\ C$, $r=0.999\ 8$	71.748~717.480
PC-C	$A=6\ 308.0\ C-1\ 699.8$, $r=0.999\ 8$	$A=6\ 286.1\ C$, $r=0.999\ 8$	33.960~339.600

2.3.2 精密度试验 取批号 20140507 供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下,连续进样 6 次,结果表儿茶素、原花青素 B2、原花青素 A2、PC-C 的峰面积平均值 RSD 分别为 0.12%、0.37%、0.12%、0.20%。以表儿茶素的保留时间和峰面积为参照,各共有峰的相对保留时间和峰面积 RSD 均 $\leq 2.5\%$,相似度均为 1.0,符合指纹图谱技术要求,表明仪器精密度

良好。

2.3.3 稳定性试验 取批号 20140507 供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下,在 0、4、8、12、18、24 h 分别进样测定,结果表儿茶素、原花青素 B2、原花青素 A2、PC-C 的峰面积平均值 RSD 分别为 0.07%、0.74%、0.09%、0.26%。以表儿茶素的保留时间和峰面积为参照,各共有峰的相对保留时间和峰面积

RSD 均 $\leq$ 2.5%，相似度均为 1.0，符合指纹图谱技术要求，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取批号 20140507 荔枝多酚提取物 6 份，按“2.1”项下供试品溶液制备方法处理，在“2.1”项色谱条件下测定，表儿茶素、原花青素 B2、原花青素 A2、PC-C 平均质量分数分别为 13.37%、0.86%、10.44%、5.32%，RSD 分别为 1.12%、1.86%、1.58%、1.33%。以表儿茶素的保留时间和峰面积为参照，各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 $\leq$ 5%，相似度均大于 0.990，符合指纹图谱技术要求，表明本法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取批号 20140507 荔枝多酚提取物 50 mg，置 100 mL 量瓶中，共 6 份，分别加入含表儿茶素、原花青素 B2、原花青素 A2、PC-C 对照品各 730.9、65.35、537.9、263.0 μ g/mL 的混合对照品溶液 10 mL，按供试品溶液制备方法制备，分别按“2.1”项色谱条件进样分析，计算加样回收率及其 RSD，结果表儿茶素、原花青素 B2、原花青素 A2、PC-C 平均加样回收率分别为 99.8%、97.9%、100.9%、100.0%，RSD 分别为 1.16%、0.67%、1.36%、1.18%。表明方法的准确度符合要求。

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 指纹图谱共有模式的建立及部分共有峰的指认及定位 将 22 批样品指纹图谱导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”（2012.130723 版），生成指纹图谱共有模式（对照指纹图谱，R），其中 19 个色谱峰为共有峰，见图 1。14 号峰的分子离子 $[M-H]^-$ m/z 577.20 与 Friedrich 等^[27]报道的 B 型原花青素二聚体在 ESI 负离子模式下检测的分子离子质量数一致，推测为 B 型原花青素二聚体。

12、16 和 17 号峰的分子离子分别为 $[M-H]^-$ m/z 863.10、 $[M-H]^-$ m/z 863.20 和 $[M-H]^-$ m/z 863.20，与 Gu 等^[28]报道的 ESI 负离子模式下 A 型原花青素三聚体的分子离子质量数一致，比 B 型原花青素三聚体在 ESI 负离子模式下的分子离子少了 2 个质子，推测 3 个组分均为 A 型原花青素三聚体。19 号峰的分子离子 $[M-H]^-$ m/z 575.10 与 Roux 等^[29]报道的 ESI 负离子模式下 A 型原花青素二聚体的分子离子质荷比一致，与 B 型原花青素二聚体在质谱 ESI 负离子条件下的分子离子相比，少了 2 个质子，推测 19 号峰为 A 型原花青素二聚体。

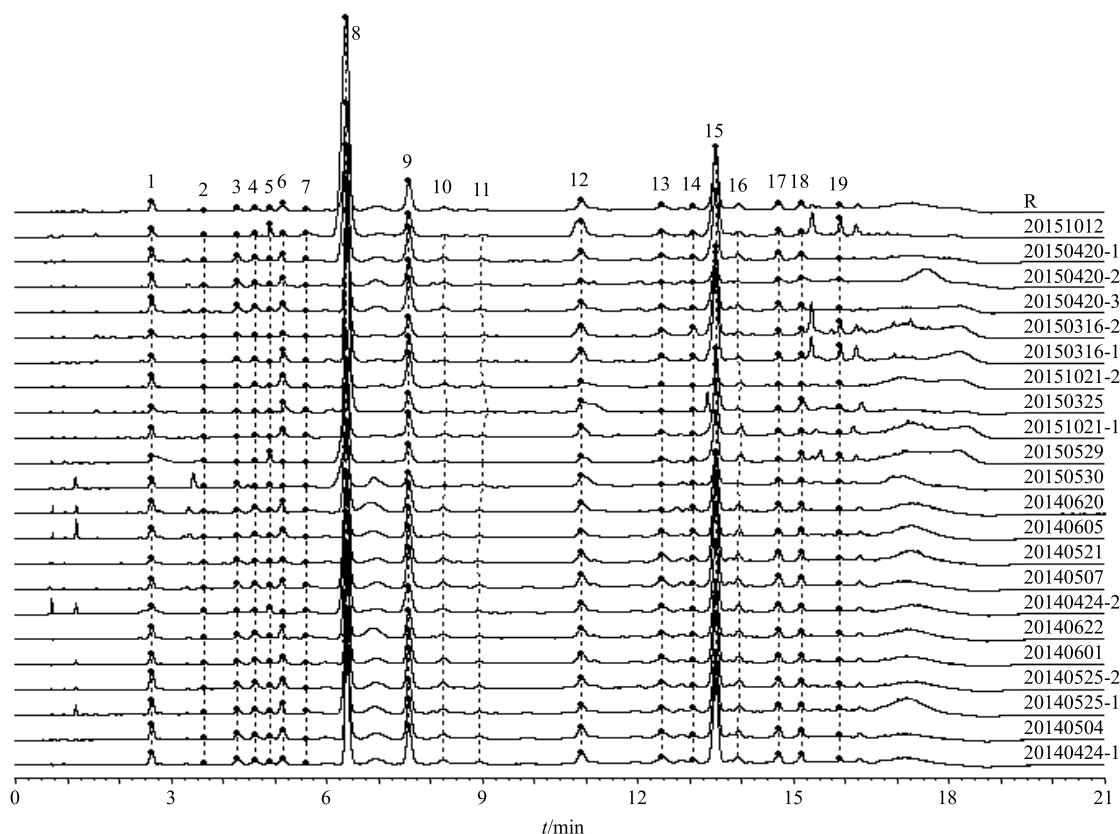


图 1 22 批荔枝多酚提取物 UPLC 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 UPLC fingerprint of 22 batches of polyphenol in extracts of *Litchi chinensis* and reference fingerprint (R)

根据 MS 图、UV 光谱图(图 2)及相对分子质量初步确定:12、16 和 17 号峰为原花青素 A 型三聚体,14 号峰为 B 型原花青素二聚体,19 号峰为原花青素 A 型二聚体。通过与混合对照品谱图(图 3)各成分进行比对,指认了 19 个共有峰中的 4 个,分别为 6 号峰(原花青素 B2)、8 号峰(表儿茶素)、

9 号峰(PC-C)、15 号峰(原花青素 A2)。

以表儿茶素为参照峰考察各待测组分,计算各共有指纹峰的保留时间、相对保留时间和相对峰面积,见表 3。22 批荔枝多酚提取物部分共有峰保留时间及相对峰面积差异较大,相对保留时间无明显差异,故采用相对保留时间对共有峰进行定位。

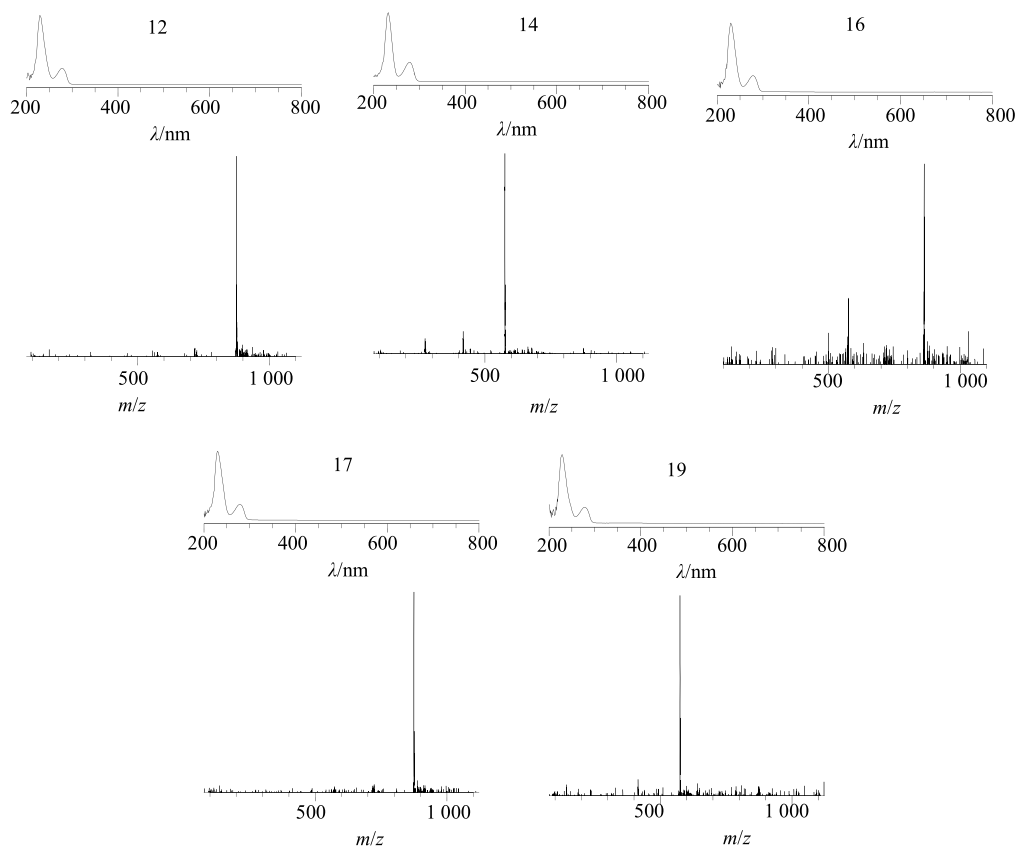
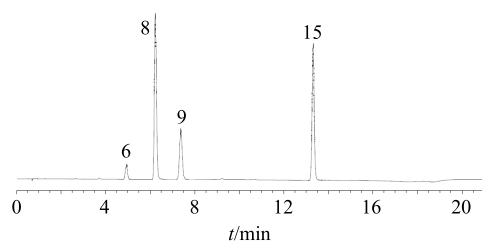


图 2 12、14、16、17 及 19 号色谱峰的质谱和 UV 光谱组合图

Fig. 2 MS and UV spectra combination chart of component chromatographic peaks 12, 14, 16, 17, and 19



6-原花青素 B2 8-表儿茶素 9-PC-C 15-原花青素 A2
6-procyanidin B2 8-epicatechin 9-PC-C 15-procyanidin A2

图 3 混合对照品 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substances

2.4.2 指纹图谱相似度评价 采用药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)对 22 批荔枝多酚提取物的指纹图谱进行相似度评价。以批号 20140507 为参照谱图,以平均数法生成

22 批荔枝多酚提取物的对照谱图,22 批荔枝多酚提取物的相似度分别为 0.995、0.996、0.972、0.997、0.977、0.996、0.992、0.987、0.958、0.963、0.975、0.906、0.989、0.988、0.950、0.928、0.985、0.983、0.993、0.920、0.997、0.967。

2.5 QAMS 研究

采用斜率比值法^[30]:通过各对照品校正后曲线的斜率比求得 f 。 f 的计算公式为 $f = k_S/k_R$, 式中 k_S 、 k_R 分别为表儿茶素及其他待测组分对照品经校正后的回归方程的斜率 (k)。在定量测定时,以单一的表儿茶素作为对照品,计算供试品中表儿茶素的量,其他待测成分测定公式为 $C_x = fA_xNW/(A_S/C_S)$ 。式中 N 、 W 、 A_x 和 C_x 分别为供试品中某待测成分 x 的稀释倍数、称样量、峰面积和质量浓度, A_S 和 C_S

表 3 荔枝 UPLC 指纹图谱技术参数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Technical parameters for UPLC fingerprint of *Litchi chinensis* ($\bar{x} \pm s$)

共有峰号	保留时间/min	相对保留时间	相对峰面积	共有峰指认
1	2.644±0.053	0.413±0.001	0.102±0.057	
2	3.722±0.118	0.582±0.007	0.014±0.009	
3	4.381±0.101	0.686±0.002	0.044±0.035	
4	4.687±0.119	0.734±0.003	0.038±0.024	
5	4.896±0.112	0.766±0.002	0.013±0.007	
6	5.072±0.117	0.794±0.002	0.074±0.044	原花青素 B2
7	5.428±0.132	0.849±0.004	0.016±0.019	
8 (S)	6.388±0.138	—	—	表儿茶素
9	7.592±0.196	1.188±0.005	0.366±0.163	PC-C
10	8.267±0.216	1.294±0.006	0.057±0.029	
11	8.773±0.125	1.397±0.003	0.033±0.015	
12	10.925±0.225	1.710±0.007	0.149±0.076	A 型原花青素三聚体
13	12.603±0.197	1.973±0.013	0.087±0.034	
14	13.143±0.202	2.058±0.014	0.026±0.020	B 型原花青素二聚体
15	13.503±0.192	2.114±0.016	0.678±0.181	原花青素 A2
16	13.916±0.242	2.179±0.013	0.042±0.031	A 型原花青素三聚体
17	14.730±0.183	2.306±0.022	0.081±0.049	A 型原花青素三聚体
18	15.214±0.244	2.382±0.018	0.058±0.032	
19	15.943±0.259	2.500±0.018	0.028±0.030	A 型原花青素二聚体

分别为供试品中表儿茶素的峰面积及质量浓度。计算内标物表儿茶素对其他待测成分原花青素 B2、原花青素 A2、PC-C 的 f ，见表 4。

2.5.1 f 耐用性试验 通过改变体积流量、柱温及检测波长，考察 f 的耐用性。各变动因素及结果见表 5，结果表明， f 的耐用性良好，见表 5。

2.5.2 QAMS 与外标法测定结果比较 采用 QAMS

表 4 f 计算结果

Table 4 Calculation results of f

对照品	k	f
表儿茶素	6 154.0	1.000 0
原花青素 B2	6 072.4	1.013 4
原花青素 A2	6 538.7	0.941 2
PC-C	6 286.1	0.979 0

表 5 f 的耐用性试验

Table 5 Robustness test of f

条件	变动因素	f			
		表儿茶素	原花青素 B2	原花青素 A2	PC-C
原条件	色谱条件 2	1.000 0	1.013 4	0.941 2	0.979 0
波长	275 nm	1.000 0	1.033 9	0.945 2	1.003 4
	285 nm	1.000 0	0.993 6	0.914 7	0.922 5
柱温	30 °C	1.000 0	1.021 4	0.939 8	0.977 3
	40 °C	1.000 0	1.064 4	0.958 6	0.987 2
体积流量	0.3 mL·min ⁻¹	1.000 0	1.031 6	0.943 8	0.978 4
	0.4 mL·min ⁻¹	1.000 0	1.050 2	0.953 6	0.986 2
平均值		/	1.029 8	0.942 4	0.976 3
RSD/%		/	2.3	1.5	2.6

(以表儿茶素为内标物) 计算各待测成分的量, 并与外标法测得的供试品中各待测成分的量值进行比较, 2 种方法测定的结果见表 6。

比较传统外标法的实测值和 QAMS 的计算值结果, t 检验结果表明, 2 种方法没有差别 ($P > 0.25$),

说明建立的 QAMS 对荔枝提取物进行定量测定的结果可靠。

2 种方法所得不同部位中 4 种组分总量见表 6。以 QAMS 法结果做图, 见图 4。未成熟期均比成熟期高, 且在花和未成熟叶中最高, 核中最低。

表 6 荔枝提取物中 4 种成分的测定结果

Table 6 Total amounts of four compounds in *Litchi chinensis* extract

部位	批号	表儿茶素/%	原花青素 B2/%		原花青素 A2/%		PC-C/%		总量/%	
		外标法	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS
未成熟皮	20140424-1	12.58	0.65	0.66	8.84	8.90	4.48	4.51	26.55	26.65
	20140424-2	15.08	0.62	0.62	10.23	10.30	5.06	5.10	30.98	31.10
	20140504	16.14	0.92	0.92	9.52	9.59	5.17	5.21	31.75	31.86
	20140507	13.78	0.86	0.87	10.43	10.51	5.37	5.41	30.44	30.57
	20140521	10.39	0.42	0.43	10.99	11.07	4.69	4.72	26.49	26.61
	20140525-1	15.06	0.96	0.96	8.84	8.91	5.04	5.10	29.89	30.01
	20140601	14.43	0.67	0.67	9.00	9.07	4.60	4.64	28.70	28.81
	20150420-1	15.30	0.69	0.70	9.37	9.37	5.17	5.17	30.53	30.54
成熟皮	20140525-2	8.63	1.04	1.05	6.73	6.78	4.08	4.11	20.47	20.56
	20140605	7.73	0.89	0.90	6.33	6.38	4.01	4.04	18.96	19.04
	20140620	10.58	1.10	1.10	6.94	6.99	3.82	3.85	22.43	22.52
	20140622	11.65	1.16	1.17	6.96	7.01	3.58	3.61	23.35	23.44
未成熟核	20150420-2	5.30	0.79	0.79	3.17	3.18	3.79	3.80	13.04	13.06
成熟核	20150530	5.50	0.06	0.06	4.66	4.67	2.54	2.55	12.76	12.76
生理落果	20150420-3	16.21	0.88	0.88	7.82	7.92	5.20	5.21	30.11	30.21
嫩枝	20150316-2	16.32	1.40	1.40	10.84	11.01	3.08	3.08	31.64	31.81
成枝	20151021-1	10.06	0.93	0.94	7.22	7.23	3.11	3.13	21.32	21.35
老枝	20151021-2	7.11	1.37	1.37	2.95	3.04	5.11	5.12	16.54	16.64
嫩叶 A	20150316-1	24.20	0.44	0.44	11.42	11.43	3.85	3.86	39.91	39.93
嫩叶 B	20151012	30.77	1.38	1.38	11.27	11.27	3.66	3.66	47.08	47.08
成熟叶	20150529	9.88	1.28	1.28	6.36	6.36	2.26	2.26	19.78	19.78
花	20150325	29.63	1.38	1.38	8.56	8.56	3.30	3.30	42.87	42.87

3 讨论

本实验采用指纹图谱结合 QAMS 评价模式, 考察了 22 批不同荔枝原材料得到的多酚提取物的稳定性及一致性。通过 PAD 在线检测, UV 光谱显示 280 nm 为荔枝多酚类成分的特征吸收波长, 且出峰较多、丰度较高, 故选择 280 nm 为测定波长。采用 QAMS 测定荔枝多酚提取物, 表儿茶素为荔枝多酚提取物的成分, 其量较高、稳定且较其他 3 个成分易得, 故选为内标物; 文献多采用平均值法计算校正因子, 本实验采用标准曲线斜率比值计算校正因子, 避免单个点偏差大造成的误差。

指纹图谱中已知组分采用对照品确认; 其他共有峰先根据 UV 光谱确定为多酚类物质, 再结合 ESI 负离子模式下检测的分子离子质量数和文献报道确认了 3 个 A 型原花青素三聚体、1 个 A 型原花青素二聚体和 1 个 B 型原花青素二聚体。为进一步考察荔枝多酚类物质提供了参考。

采用 QAMS 测定 22 批荔枝多酚提取物 4 个已知组分量并与外标法比较。2 种方法荔枝多酚提取物中 4 种指标成分量测定值无显著差异。22 批荔枝多酚提取物中 4 种已知成分总量未成熟期均高于成熟期。提取物中多酚以 A 型原花青素为主; 单体主

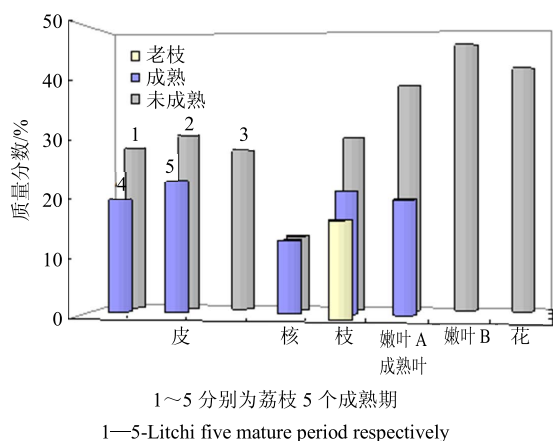


图 4 22 批荔枝多酚提取物中 4 种组分总量

Fig. 4 Total contents of four components in polyphenol extract of *Litchi chinensis*

要是表儿茶素, 2 个采收期嫩叶及花中其量最高。已确定的 B 型原花青素为原花青素 B2, 成熟荔枝核中原花青素 B2 远低于未成熟核及其他部位。核及老枝中 4 种指标成分总量最低, 由于取样少, 有待进一步研究, 建议暂不作为荔枝多酚的原材料。本实验初步得出已知的 4 个组分在不同部位的分布、不同生长期其量的变化规律, 为荔枝多酚有效成分的收集、研究奠定了基础。

总的来说, 22 批荔枝原材料多酚提取物特征指纹图谱相似度大于 0.90, 按指纹图谱相似度评价标准, 整体上成分结构一致。但是采收期不同、产地不同及部位不同导致各指标成分量不同。荔枝核及老枝除外, 其他 19 批中表儿茶素、原花青素 B2、原花青素 A2 和 PC-C 的量分别为 7.73%~30.77%、0.43%~1.40%、6.36%~11.43%和 2.26%~5.41%。故暂定荔枝多酚提取物中表儿茶素、原花青素 B2、原花青素 A2 和 PC-C 的量应分别不低于 5.0%、0.5%、5.0%和 3.0%, 4 个成分总量不低于 20.0%。指纹图谱结合 QAMS 测定单个组分的量解决了对照品难以获得或不稳定的难题, 并保证了荔枝提取物的稳定性及一致性。2014 年广东荔枝产量 124 万吨, 预计在 2020 年总产量达 150 万吨以上, 2015 年 75%在省内鲜销^[31]。大量被废弃的荔枝果皮和果核、成熟过程中的生理落果、枝和叶等的综合应用可扩大多酚的来源。除多酚类成分以外, 荔枝原材料中还有黄酮、皂苷等组分。其他成分的进一步开发研究更是达到了变废为宝、物尽其用的效果。

参考文献

[1] 尤春雪, 张振秋, 李 峰, 等. HPLC 波长切换技术对

葛根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 616-621.

[2] 马鸿雁, 周婉珊, 褚夫江, 等. 苦参中黄酮类成分的高效液相指纹图谱及 5 种成分的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2690-2695.

[3] 黄 洋, 邵慧凯, 路 丽, 等. 不同采收期小叶榕叶 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 271-275.

[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] 田 璐, 闫海霞, 傅欣彤, 等. 一测多评法同时测定川芎、当归饮片片中多种化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 848-854.

[6] 何 兵, 刘 艳, 杨世艳, 等. 一测多评同时测定款冬花中 10 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1518-1524.

[7] 卿大双, 罗维早, 孙建彬, 等. 一测多评法测定黄连及其炮制品中 6 种生物碱 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 324-329.

[8] 朱春胜. 基于谱效关系的菊苣降尿酸物质基础及质量评价研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[9] 张 婷, 郑 夺, 王文彤, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在参苓养心颗粒质量评价中的应用研究 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1920-1925.

[10] Stavrianidi A, Stekolshchikova E, Porotova A, et al. Combination of HPLC-MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2017, 132(5): 87-92.

[11] Li D W, Zhu M, Shao Y D, et al. Determination and quality evaluation of green tea extracts through qualitative and quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) [J]. *Food Chem*, 2016, 197(B): 1112-1120.

[12] 汪金莲, 邱业先, 扶教龙, 等. 茶多酚对稻瘟病菌的抑制作用及抑菌机理 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(5): 918-922.

[13] 李 楠. 海棠多酚的种类及其体外抗氧化活性和抑菌活性研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014.

[14] 刘忠义, 彭 丽, 包 浩, 等. 籽瓜皮多酚的提取及其抑菌作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(1): 173-178.

[15] 王立峰, 陈静宜, 谢慧慧, 等. 薏米多酚细胞抗氧化及 HepG2 细胞毒性和抗增殖作用 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2990-3002.

[16] 卢晓霆, 许中畅, 王田田, 等. 玉米多孔淀粉-海藻酸钠-壳聚糖-葡萄糖多酚缓释微胶囊的制备及表征 [J]. 中

- 草药, 2016, 47(13): 2252-2259.
- [17] 冯亮, 汪燕, 潘小玲. 茶多酚对酒精性肝损伤大鼠的抗炎抗氧化保护作用 [J]. 中国药业, 2015(22): 37-39.
- [18] 游庭活. 桑椹多酚类化合物抗氧化及延缓衰老作用研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [19] 张如楠, 吴冬梅, 杨留勤. 茶多酚对食管癌 Eca-109 细胞生长的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(19): 2727-2729.
- [20] 王驰, 陈鸿雁, 叶琳, 等. 茶多酚与抗肿瘤药物联合作用对人鼻咽癌耐药细胞株 HNE-1 增殖抑制的影响 [J]. 中国药房, 2009, 20(1): 33-35.
- [21] 李红月, 陈超. 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 117-119.
- [22] 王美菊, 陶明焯, 牛文颖, 等. 石榴叶多酚对急性酒精性肝损伤小鼠肾脏、心脏及免疫器官的抗氧化作用 [J]. 食品科学, 2016, 37(1): 208-212.
- [23] 董淑英, 童旭辉, 刘浩, 等. 石榴多酚对大鼠心肌缺血-再灌注损伤后心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中药材, 2012, 35(11): 1824-1828.
- [24] 吕昕泽, 吴秀祯, 张卫. 葡萄多酚对心肌保护作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 46-52.
- [25] 佟屏亚. 果树史话 [M]. 北京: 农业出版社, 1983.
- [26] 李焕清, 邓红, 张蜀, 等. 响应面法优化荔枝皮原花青素的提取工艺 [J]. 广东农业科学, 2015, 42(9): 93-98.
- [27] Friedrich W, Eberhardt A, Galensa R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Eur Food Res Technol*, 2000, 211(1): 56-64.
- [28] Gu L W, Kelm M A, Hammerstone J F, *et al.* Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods [J]. *J Mass Spectrom*, 2003, 38(12): 1272-1280.
- [29] Le Roux E, Doco T, Sarni-Manchado P, *et al.* A-type proanthocyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(7): 1251-1258.
- [30] 何兵, 杨世艳, 张燕. 一测多评中待测成分校正和定位的新方法研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1653-1659.
- [31] 余华荣, 周灿芳, 万忠, 等. 2015 年广东荔枝产业发展形势与对策建议 [J]. 广东农业科学, 2016, 43(4): 21-24.