

HPLC 指纹图谱结合一测多评法的睡莲花药材质量分析

左递军¹, 李晨阳², 杨军³, 徐芳², 赵军^{2*}

¹新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054; ²新疆药物研究所维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830003;

³乌鲁木齐绿之园园林科技有限公司, 乌鲁木齐 830011

摘要:建立睡莲花药材 HPLC 指纹图谱及 7 种成分一测多评的含量测定方法。采用如下色谱条件建立 HPLC 指纹图谱: Phenomenex Gemini NX-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-0.2% 磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 266 nm。对数据进行相似度分析、主成分分析和聚类分析。同时以没食子酸为内参物, 建立没食子酸甲酯等 6 种成分的相对校正因子。结果显示 17 批睡莲花药材与参照图谱 S16 的相似度在 0.901 ~ 1.000 之间, 并明确了 11 个共有峰, 对 7 个共有峰进行了指认; 2 批市售图谱与 S16 图谱相似度为 0.568 和 0.730, 说明栽培和野生睡莲花药材与市售样品之间化学信息差异较大。主成分分析、聚类分析法、偏最小二乘-判别分析结果证明了这一结论。一测多评结果显示, 没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的相对校正因子分别为 0.965 0, 0.974 0, 1.201 3, 0.175 4, 1.160 3, 2.117 3, RSD 分别为 0.37%、0.38%、0.32%、1.76%、0.37% 和 0.08% (n = 8)。一测多评法测定结果与外标法测定结果接近。建立的 HPLC 指纹图谱结合一测多评含量测定法简便可行, 在部颁标准的基础上为睡莲花药材质量控制方法的提升提供了参考依据。

关键词:睡莲花药材; HPLC 指纹图谱; 化学成分; 聚类分析; 主成分分析; 一测多评

中图分类号: O657.72; R931.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)7-1112-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.7.002

Quality analysis of Nymphaeae Flos based on HPLC fingerprint and QAMS

ZUO Di-jun¹, LI Chen-yang², YANG Jun³, XU fang², ZHAO Jun^{2*}

¹College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; ²Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830003, China;

³Urumqi Green-Park Landscaping Development Co., Ltd., Urumqi 830011, China

Abstract: To establish the HPLC fingerprint of Nymphaeae Flos and Quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) for seven contents. The HPLC fingerprint was established by Phenomenex Gemini NX-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength were 266 nm. The data were studied by Similarity analysis, cluster analysis and principal component analysis. Gallic acid was used as an internal standard to calculate the relative correction factors of the other six constituents. A total of eleven common peaks were identified and seven components were identified for the analysis of 17 batches of Nymphaeae Flos. The similarity of 17 batches of samples was greater than 0.9. The HPLC similarity of two commercial samples and S16 was 0.568 and 0.730, which the results show that commercial Nymphaeae Flos were different from cultivated and wild Nymphaeae Flos. Principal component analysis, cluster analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were confirmed this conclusion. With gallic acid was the reference, the relative correction factors of methyl gallate, isostrictinin, geraniin, ellagic acid, nicotiflorin, pentagalloylglucose were 0.965 0, 0.974 0, 1.201 3, 0.175 4, 1.160 3 and 2.117 3, RSD were 0.37%, 0.38%, 0.32%, 1.76%, 0.37% and 0.08% (n = 8). At the same time, the result obtained by QAMS approximated those obtained by external standard method (ESM). The established fingerprint and QAMS content determination method of Nymphaeae Flos were feasible and provide a reference for the improvement of the quality control method of Nymphaeae Flos.

收稿日期: 2022-11-28

接受日期: 2023-05-18

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(2021D01D14)

* 通信作者 E-mail: zhaojun21cn@163.com

Key words: Nymphaeae Flos; HPLC fingerprints; chemical constituents; cluster analysis; principal component analysis; quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS)

睡莲花药材来源为睡莲科 (Nymphaeaceae) 睡莲属多年生水生草本植物雪白睡莲 *Nymphaea candida* 的干燥花蕾, 具有降热止咳、镇静安神、益心护脑之功效, 被广泛应用在祖卡木颗粒、炎消迪娜儿糖浆、降热比那甫西糖浆等复方制剂中^[1]。现代药理学研究表明睡莲花药材提取物具抗氧化、抗炎、降血糖、保肝及神经保护等多种生物活性^[2-8], 多酚及黄酮类成分是其提取物主要的特征性成分^[9,10]。雪白睡莲主要分布于我国新疆伊犁、博湖、阿勒泰以及中亚一些地区的池塘沼泽湖泊之中^[11,12]。然而, 由于近年来人类对自然的开发, 雪白睡莲赖以生存的水塘及湖泊环境日益缩小, 野生雪白睡莲药材产量也日渐减少, 现已被列入国家二级濒危野生植物名录中。目前, 药材市场上的市售睡莲花药材基本依赖进口, 但这些进口睡莲花药材存在来源广泛, 基源不清的缺陷, 其中有文献报道市面上销售的睡莲花药材可能是柔毛齿叶睡莲^[13]。经过多年对产自博湖野生品种的引种驯化, 乌鲁木齐绿之园园林工程有限公司已成功栽培种植了雪白睡莲花。因此, 在采集不同来源不同产地睡莲花药材和 2 批市售样品以及柔毛齿叶睡莲的基础上, 构建了睡莲花药材的 HPLC 指纹图谱与一测多评相结合的测定分析方法, 并将睡莲花药材与市售样品和柔毛齿叶睡莲进行了初步的分析比较, 以期对睡莲花药材的开发应用提供数据参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent-1260 DAD 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司)。

1.2 材料

栽培种睡莲花于 2021 年 5~8 月采自绿之源园林科技有限公司乌鲁木齐安宁渠镇种植基地的不同栽培池 (S1~S15), 其原植物引种地是新疆博斯腾湖和额尔齐斯河流域的北屯市; 野生睡莲花采自新疆伊犁地区 (S16、S17), 均由新疆药物研究所何江研究员和乌鲁木齐绿之园园林科技有限公司杨军高级工程师鉴定为雪白睡莲花 *Nymphaea candida* 的花蕾, 样品信息见表 1。市售睡莲花药材购自新疆乌鲁木齐齐神香草公司 (S18, 购买时间: 20200924) 以及新疆乌鲁木齐二道桥药材市场 (S19, 购买时间: 20211221)。柔毛齿叶睡莲 *Nymphaea pubescens* 由中国科学院武汉植物园刘艳玲研究员提供 (S20, 采摘时间: 20210718)。

对照品烟花苷 (纯度 98.9%, 自制)、睡莲酚 (纯度 98.1%, 自制), 均已经通过质谱和核磁确证结构; 没食子酸 (批号: 110831-201906, 中国食品药品检定研究所); 没食子酸甲酯 (批号: MUST-21071707)、鞣花酸 (批号: MUST-14031010)、老鹳草素 (批号: MUST-12041702)、1,2,3,4,6-五没食子酰基葡萄糖 (批号: MUST-21092610) (成都曼思特生物科技有限公司)。提取溶剂为分析甲醇, 流动相甲醇、乙腈为色谱醇。

表 1 17 批睡莲花药材样品

Table 1 Seventeen batches of Nymphaeae Flos samples

样品号 Sample No.	来源 Source	采摘时间 Picking time	样品号 Sample No.	来源 Source	采摘时间 Picking time
S1	安宁渠种植基地	2021.07.06	S10	安宁渠种植基地	2021.07.13
S2	安宁渠种植基地	2021.08.04	S11	安宁渠种植基地	2021.08.04
S3	安宁渠种植基地	2021.05.30	S12	安宁渠种植基地	2021.07.30
S4	安宁渠种植基地	2021.07.06	S13	安宁渠种植基地	2021.07.30
S5	安宁渠种植基地	2021.07.06	S14	安宁渠种植基地	2021.05.30
S6	安宁渠种植基地	2021.07.30	S15	安宁渠种植基地	2021.07.13
S7	安宁渠种植基地	2021.07.13	S16	伊宁县	2021.06.24
S8	安宁渠种植基地	2021.08.04	S17	伊宁县	2021.09.01
S9	安宁渠种植基地	2021.08.19			

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性

色谱柱:Phenomenex Gemini NX-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~35 min,5%→15% A;35~65 min,15%→18% A;65~70 min,18%→20% A;70~

75 min,20%→5% A);柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:266 nm;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,药材中没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的色谱峰与其他成分分离度良好,均大于1.5,理论塔板数均大于8 000,结果见图1。

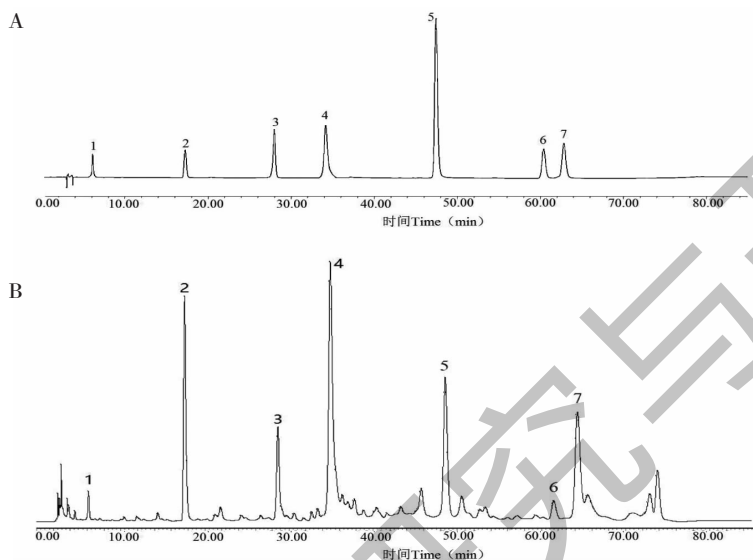


图1 对照品(A)和样品(B)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance(A) and samples (B)

注:1:没食子酸;2:没食子酸甲酯;3:睡莲酚;4:老鹳草素;5:鞣花酸;6:烟花苷;7:1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖。Note:1:Gallic acid; 2: Methyl gallate;3: Isostrictinin;4: Geraniin;5: Ellagic acid;6: Nicotiflorin;7: Pentagalloylglucose.

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖对照品适量,加甲醇制成含没食子酸0.279 6 mg/mL,没食子酸甲酯0.470 0 mg/mL,睡莲酚0.960 0 mg/mL,老鹳草素1.020 0 mg/mL,烟花苷0.237 2 mg/mL,鞣花酸0.670 0 mg/mL和1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖1.070 0 mg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取睡莲花药材粉末(过2号筛)0.25 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入80%甲醇20 mL,加热回流提取2 h,滤过至25 mL容量瓶中,加入80%甲醇定容,摇匀,用0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立

2.3.1 方法学验证

2.3.1.1 精密度试验

日内精密度试验:取S1样品粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,连续进样6次,结果表明,睡莲花药材的各个共有峰的相对保留时间RSD为0.09%~0.66%,共有峰的峰面积比值的RSD为0.15%~2.90%,符合指纹图谱技术要求中精密度试验(RSD<3%)的有关规定,表明仪器精密度良好。

日间精密度试验:取S1样品粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,连续进样6 d,结果表明,睡莲花药材的各个共有峰的相对保留时间RSD为0.07%~0.82%,共有峰的峰面积比值的RSD为0.70%~2.88%;表明该方法日间精密度良好。

2.3.1.2 重复性考察

取睡莲花药材样品(S1)6份,照“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液,再依照“1.2.2”项下确定的色谱条件进样。结果表明,睡莲花药材的各个共有峰的相对保留时间RSD为0.20%~0.66%,共有峰的峰面积比值的RSD为1.17%~2.90%,结果

符合指纹图谱研究技术中的相关要求,说明建立的方法重复性符合要求。

2.3.1.3 稳定性考察

取 S1 样品粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依照“2.1”项下所确立的色谱条件进样,之后分别在不同的时间点(0、3、6、9、12、24 h)进行考察,结果表明,睡莲花药材的各个共有峰的相对保留 RSD 为 0.43% ~ 0.89%,共有峰的峰面积比值的 RSD 为 0.63% ~ 2.60%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.2 图谱生成及相似度评价

取 17 批睡莲花药材粉末,按“2.2.2”项下方法

制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,将 17 批睡莲花药材(S1 ~ S17)色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版软件),设定样品 S16 的图谱作为参照,采用多点校正全谱峰匹配,共标定 11 个共有峰,中位数法生成指纹图谱共有模式(R)(见图 2)。其中峰 1、2、3、4、6、8、9 分别是没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖。计算得到的 17 批次雪白睡莲花样品与对照指纹图谱的相似度结果均大于等于 0.9。表明 17 批睡莲花药材一致性好。

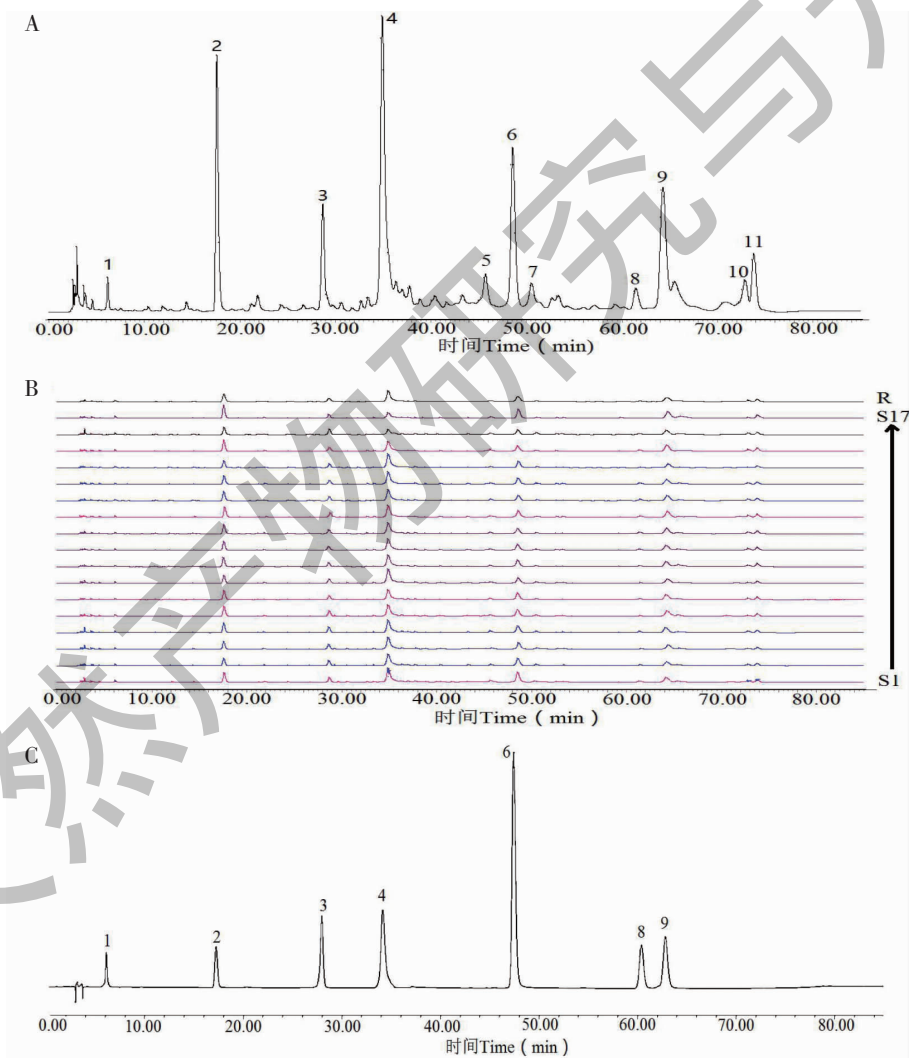


图 2 17 批样品 HPLC 指纹共有模式图谱(A)、HPLC 指纹图谱(B)及对照品 HPLC 色谱图(C)

Fig. 2 Common mode pattern of HPLC fingerprint map for seventeen batches of samples (A), HPLC fingerprints(B), and HPLC chromatogram of a reference substance (C)

注:1:没食子酸;2:没食子酸甲酯;3:睡莲酚;4:老鹳草素;6:鞣花酸;8:烟花苷;9:1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖。Note:1:Gallic acid; 2: Methyl gallate;3: Isostrictiniin;4: Geranii;6: Ellagic acid;8: Nicotiflorin;9: Pentagalloylglucose.

2.3.3 聚类分析(HCA)

采用 SPSS 25.0 软件,以 17 批睡莲花药材和 2 批市售睡莲花药材的共有峰相对峰面积为变量,通过组间连接和平方欧式距离法绘图(见图 3)。结果表明,当平方欧式距离为 5 时,19 批样品聚为 2 类,

第 1 类为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10、S11、S12、S13、S14、S15、S16、S17,第 2 类为 S18 和 S19。总体来说栽培和野生的睡莲花药材样品间差异较小,而与市售睡莲花药材差别较大,两者的化学指纹峰存在差异,可以采用聚类方式进行识别,并分类。



图 3 聚类分析结果

Fig. 3 Cluster analysis results

2.3.4 主成分分析(PCA)

采用 SPSS 25.0 软件对 17 批睡莲花药材进行主成分分析,提取特征值大于 1 的 4 个主成分,其累积方差贡献率达 89.481%,可代表指纹图谱中各成分的大部分信息,见表 2。载荷矩阵可反映各变量对主成分的综合贡献,结合表 2 特征值和方差贡献率、因子载荷矩阵进行考察,结果见表 3,其中第 1 主成分主要受 1(没食子酸)、2(没食子酸甲酯)和 3 号峰(睡莲酚)的影响;第 2 主成分为 4(老鹳草素)、6 号峰(鞣花酸)和 5 号峰的影响;第 3 主成分主要受峰 7、峰 9(五没食子酰葡萄糖)和峰 8(烟花苷)的

影响;第 4 主成分主要受 10 号峰和 11 号峰的影响。

2.3.5 偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)

本实验为了更好地观察睡莲花药材主要标示性成分的组内关系,进一步做了有监督模式的 PLS-DA 判别。筛选出贡献较小的 10 个变量($VIP < 1$),按 VIP 值大小依次排序为 11 号峰、9 号峰(五没食子酰葡萄糖)、2 号峰(没食子酸甲酯)、6 号峰(鞣花酸)、3 号峰(睡莲酚)、5 号峰、7 号峰、1 号峰(没食子酸)、10 号峰和 8 号峰(烟花苷),说明不同批次睡莲花药材之间主要标示性成分差异不大,药效性质稳定,结果见图 4。

表 2 主成分特征值及方差贡献率

Table 2 Characteristic values and variance contribution rates of principal components

主成分 Principal constituent	特征值 Characteristic value	方差贡献率 Contribution rate of variance (%)	累积方差贡献率 Cumulative variance contribution rate (%)
1	4.059	36.897	36.897
2	2.563	23.301	60.198
3	1.849	16.805	77.003
4	1.372	12.477	89.481

表 3 主成分因子载荷矩阵

Table 3 Loading matrices for principal components

峰号 Peak	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	主成分 3 Principal component 3	主成分 4 Principal component 4
1	0.967	0.051	-0.017	-0.043
2	0.937	-0.003	-0.019	-0.196
3	0.889	0.187	-0.118	-0.199
4	-0.125	0.882	-0.350	-0.081
5	0.032	0.859	-0.320	-0.238
6	0.311	0.636	-0.312	0.401
7	0.577	0.269	0.641	0.315
8	-0.498	0.546	0.630	-0.167
9	-0.437	0.483	0.581	0.186
10	0.549	-0.017	0.186	0.736
11	-0.519	-0.019	-0.576	0.604

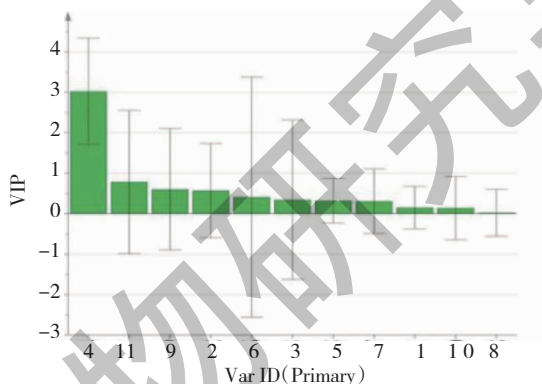


图 4 色谱峰的 VIP 得分图

Fig. 4 The VIP score plots of the chromatographic peaks

2.3.6 指纹图谱应用鉴别

将睡莲花药材、市售睡莲花药材和柔毛齿叶睡莲作为研究对象,通过建立的 HPLC 指纹图谱进行鉴别,结果显示 2020 批次(S18)、2021 批次(S19)市售睡莲花药材和柔毛齿叶睡莲(S20) HPLC 图谱与

对照指纹图谱相差较大,结果见图 5。后续对睡莲花药材与市售睡莲花药材相似度进行了计算,2 批市售睡莲花药材与对照指纹图谱的相似度仅为 0.568 和 0.730。说明栽培和野生睡莲花药材与市售样品之间化学信息差异较大。

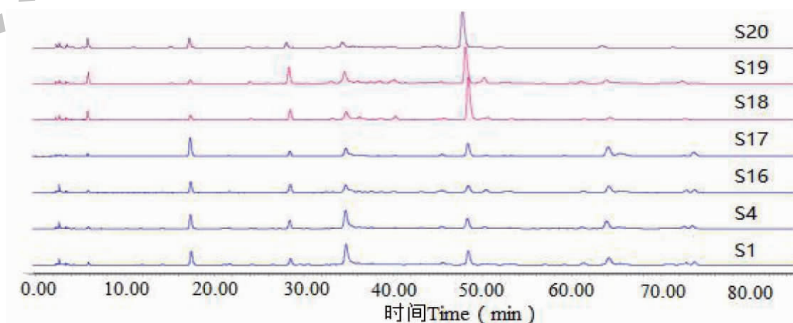


图 5 HPLC 图谱比较

Fig. 5 Comparison of HPLC chromatograms

2.3.7 正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)

为了进一步寻找睡莲花药材和市售睡莲花药材的差异标志物,采用 SIMAC 14.1 软件对样品数据进行 OPLS-DA 分析,将 19 批样品(S1 ~ S19)的共有峰导入 SIMAC 14.1 软件中,建立 OPLS-DA 模型,得分图见图 6A,19 批样品分布在中线两侧,表明 19 批睡莲花样品被较好地分为 2 类,其中睡莲花药材(S1 ~ S17)沿着 t1 轴方向大致聚为一类,市售睡莲花药材(S18 ~ S19)聚为另外一类。由模型分析验证参数可知,结实率参数 R_x^2 为 0.928,区分参数 R_y^2

为 0.913,预测参数 Q^2 为 0.768,均大于 0.5,说明模型稳定且具有良好的预测准确性。为防止该模型出现过拟合的情况,设置分类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验,得置换检验结果图 6B, R^2 回归线在 Y 轴截距为 0.249, Q^2 回归线在 Y 轴截距为 -0.778,说明所建立的模型没有出现过拟合现象,可用于判别分析睡莲花药材和市售睡莲花药材的组间差异。筛选出 VIP > 1 的色谱峰为差异标志物,具有统计学意义的 3 个差异标志物分别为没食子酸甲酯、鞣花酸和老鹳草素,是区分样品的关键色谱峰。

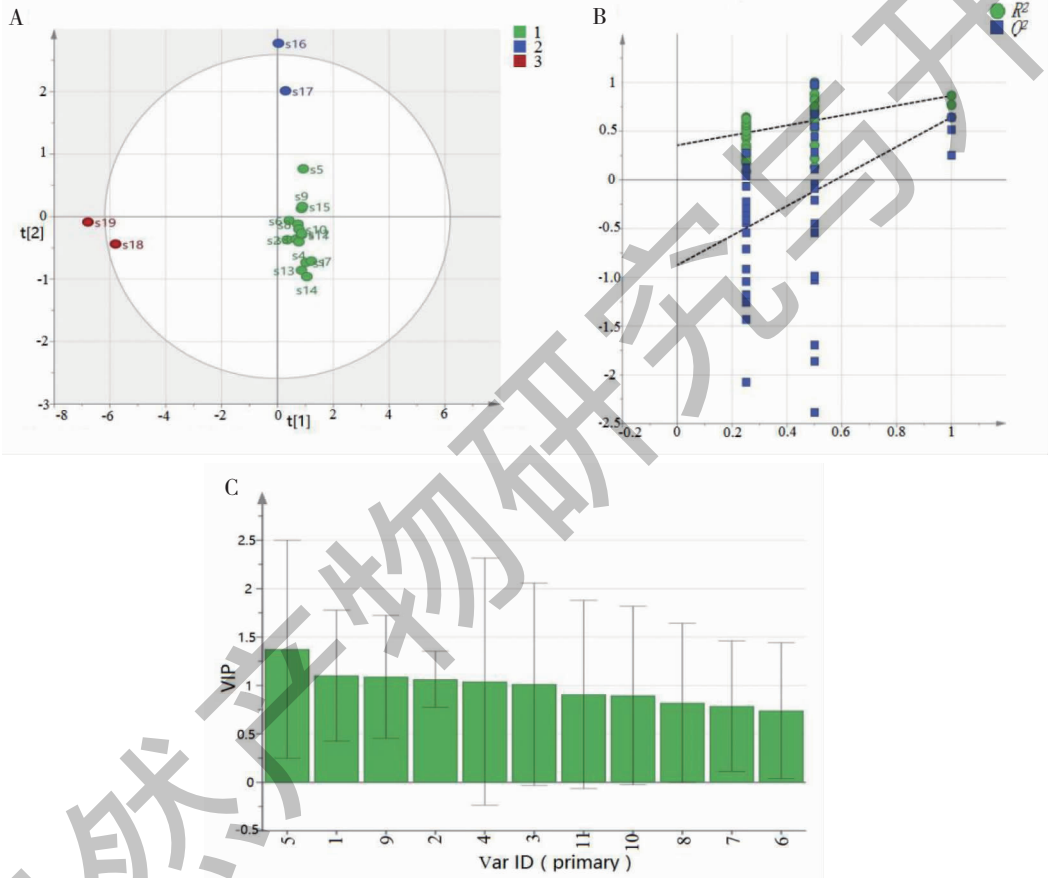


图 6 OPLS-DA 得分(A)、模型的置换检验(B)和 VIP 值图(C)

Fig. 6 OPLS-DA score plot (A), permutation test (B) and VIP (C)

2.4 一测多评法测定各成分含量

2.4.1 线性关系考察

分别精密移取没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容。按上述色谱条件分别测定稀释品及母液峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X)绘制标准曲线,得回归方

程分别为 $Y = 16\ 284X - 6.336\ 7, r = 0.999\ 9$,线性范围为 2.796 ~ 279.6 $\mu\text{g/mL}$; $Y = 17\ 662X - 36.967, r = 0.999\ 8$,线性范围为 4.970 ~ 497.0 $\mu\text{g/mL}$;

$Y = 15\ 063X + 76.725, r = 0.999\ 8$,线性范围为 9.600 ~ 960.0 $\mu\text{g/mL}$; $Y = 13\ 548X - 118.41, r = 0.999\ 4$,线性范围为 10.20 ~ 1\ 020 $\mu\text{g/mL}$; $Y = 94\ 443X - 144.38, r = 0.999\ 9$,线性范围为 6.700 ~ 670.0 $\mu\text{g/mL}$; $Y = 12\ 646X + 17.111, r = 0.999\ 9$,

线性范围为 2.372 ~ 237.2 $\mu\text{g/mL}$; $Y = 7\,399.5X - 18.361$, $r = 1$, 线性范围为 10.70 ~ 1 070 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.2 精密度的试验

2.4.2.1 日内精密度的试验

取 S1 样品粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖峰面积的 RSD 分别为 0.54%、0.42%、1.83%、1.53%、0.47%、0.20%、0.91%; 表明该方法日内精密度良好。

2.4.2.2 日间精密度的试验

取 S1 样品粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 d, 测定峰面积, 计算没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的 RSD 分别为 1.50%、1.29%、1.08%、1.87%、1.38%、0.18%、1.30%; 表明该方法日间精密度良好。

2.4.3 稳定性的试验

取 S1 样品粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项下色谱条件测定, 计算没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的 RSD 分别为 0.52%、0.94%、1.46%、0.30%、0.52%、0.24%、1.77%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性的试验

取睡莲花药材样品(S1)6份,按“2.2.2”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,平行操作6份,测得没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的RSD分别为1.49%、1.63%、1.78%、0.98%、1.58%、0.72%、1.83%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率的试验

精密称取睡莲花药材样品(S1)6份,每份0.125g,分别精密加入对照品溶液(0.2796mg/mL没食子酸对照品溶液0.4mL,0.4700mg/mL没食子酸甲酯对照品溶液1.0mL,0.9600mg/mL睡莲酚对照品溶液0.5mL,1.0200mg/mL老鹳草素对照品溶液1.0mL,0.6700mg/mL鞣花酸对照品溶液0.4mL,0.2372mg/mL烟花苷对照品溶液1.0mL和1.0700mg/mL1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖对照品溶液1.0mL)按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项已确定的色谱条件下进样,计算加样回收率。结果没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖平均加样回收率分别为99.30%、103.80%、100.61%、101.35%、96.04%、100.19%、97.23%,RSD分别为1.72%、0.72%、1.42%、1.95%、0.74%、0.71%、1.78%(见表4)。

表4 加样回收率的试验结果

Table 4 The result of recovery rate test

指标成分 Index compound	测得 Measured (g)	加入 Added (g)	理论 Theoretical (g)	回收率 Percent recovery (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
没食子酸 Gallic acid	0.2305	0.1173	0.1175	96.40	99.30	1.72
	0.2340	0.1173	0.1174	99.47		
	0.2347	0.1173	0.1175	99.94		
	0.2355	0.1173	0.1174	100.70		
	0.2326	0.1173	0.1173	98.33		
	0.2358	0.1173	0.1174	100.97		
没食子酸甲酯 Methyl gallate	2.3680	1.1580	1.1598	104.33	103.80	0.72
	2.3725	1.1580	1.1589	104.80		
	2.3596	1.1580	1.1560	103.60		
	2.3633	1.1580	1.1589	104.00		
	2.3548	1.1580	1.1580	103.34		
	2.3480	1.1580	1.1589	102.68		

续表 4(Continued Tab. 4)

指标成分 Index compound	测得 Measured (g)	加入 Added (g)	理论 Theoretical (g)	回收率 Percent recovery (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
睡莲酚 Isostrictiniin	1.180 1	0.595 2	0.593 4	98.56	100.61	1.42
	1.195 5	0.595 2	0.593 0	101.23		
	1.197 7	0.595 2	0.593 4	101.52		
	1.184 6	0.595 2	0.593 0	99.40		
	1.190 8	0.595 2	0.592 5	100.53		
	1.202 6	0.595 2	0.593 0	102.43		
老鹳草素 Geraniin	0.720 1	0.357 0	0.358 7	101.24	101.35	1.95
	0.727 9	0.357 0	0.358 4	103.50		
	0.725 0	0.357 0	0.358 7	102.61		
	0.710 9	0.357 0	0.358 4	98.74		
	0.712 4	0.357 0	0.358 1	99.23		
	0.725 2	0.357 0	0.358 4	102.75		
鞣花酸 Ellagic acid	0.607 1	0.310 9	0.311 4	95.13	96.04	0.74
	0.609 1	0.310 9	0.311 1	95.86		
	0.612 7	0.310 9	0.311 4	96.92		
	0.609 6	0.310 9	0.311 1	95.60		
	0.611 9	0.310 9	0.310 9	96.82		
	0.608 0	0.310 9	0.311 1	95.50		
烟花苷 Nicotiflorin	0.656 6	0.328 1	0.328 7	99.94	100.19	0.71
	0.656 4	0.328 1	0.328 4	99.97		
	0.656 0	0.328 1	0.328 7	99.77		
	0.654 7	0.328 1	0.328 4	99.45		
	0.658 1	0.328 1	0.328 1	100.56		
	0.661 3	0.328 1	0.328 4	101.45		
1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 Pentagalloylglucose	0.044 9	0.021 4	0.024 5	95.54	97.23	1.78
	0.045 0	0.021 4	0.024 4	96.03		
	0.045 0	0.021 4	0.024 5	95.99		
	0.045 6	0.021 4	0.024 4	98.86		
	0.045 8	0.021 4	0.024 4	99.77		
	0.045 2	0.021 4	0.024 4	97.19		

2.5 相对校正因子计算

公式为 $f_{k/i} = f_k/f_s = (C_k A_i) / (C_i A_k)$, 其中 C_k 为待测成分的含量, A_k 为待测成分的峰面积, C_i 为内标物的含量, A_i 为内标物的峰面积。

待测组分相对校正因子的计算: 取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 按照“2.1”项下的 HPLC 色谱条件进样 10 μ L, 进样 6 次, 选择没食子酸为内参物, 分别计算没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花

酸、烟花苷和 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 6 种成分的相对校正因子。测得 6 种成分的相对校正因子分别为 0.965 0、0.974 0、1.201 3、0.175 4、1.160 3、2.117 3, RSD 分别是 0.15%、0.28%、0.31%、0.26%、0.24%、0.21%。

2.6 耐用性实验

本实验考察了不同色谱柱、不同流速和不同柱温对各成分相对校正因子的影响, 结果见表 5。不

表 5 不同色谱柱、流速、柱温对相对校正因子的影响

Table 5 Effect of different columns, flow rate, column temperature on relative correction factors

考察项目 Inspection item	考察条件 Examining conditions	相对校正因子(内标没食子酸) Relative correction factors (gallic acid as the internal standard)					
		没食子酸甲酯 Methyl gallate	睡莲酚 Isostrictiniin	老鹳草素 Geraniin	鞣花酸 Ellagic acid	烟花苷 Nicotiflorin	1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 Pentagalloylglucose
色谱柱 Chromatographic column	Phenomenex Gemini NX-C ₁₈	0.965 3	0.979 2	1.201 5	0.175 5	1.162 5	2.117 5
	Agilent Eclipse XDB-C ₁₈	0.954 9	0.968 8	1.191 1	0.167 1	1.152 9	2.112 3
流速 Flow rate (mL/min)	0.8	0.965 4	0.980 0	1.201 2	0.175 0	1.166 9	2.115 9
	1	0.964 8	0.980 3	1.201 1	0.175 8	1.158 4	2.115 5
	1.2	0.965 1	0.978 5	1.199 6	0.175 8	1.160 2	2.116 3
柱温 Column temperature (°C)	25	0.965 2	0.977 2	1.201 7	0.176 0	1.165 1	2.116 9
	30	0.964 8	0.975 4	1.201 5	0.176 1	1.161 5	2.117 1
	35	0.964 8	0.977 2	1.203 3	0.175 9	1.161 1	2.114 5
平均值 Average	-	0.963 8	0.977 1	1.200 1	0.174 4	1.161 1	2.115 8
RSD (%)	-	0.37	0.38	0.32	1.76	0.37	0.08

同条件下 RSD < 2.00%, 说明重现性良好。

2.7 样品含量测定

精密称取 17 批睡莲花药材粉末各 0.25 g, 按“2.2.2”项所述方法制备, 精密吸取供试品溶液, 注入液相色谱仪进行测定, 分别采用外标法 (external standard method, ESM) 和一测多评法 (quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS) 计算没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的含

量。由表 6 可知, 2 批野生睡莲花药材之间没食子酸甲酯、鞣花酸和五没食子酰葡萄糖含量存在差异; 栽培睡莲花药材之间主要标示性成分的含量较稳定, 并无明显变化, 便于进行质量控制。栽培睡莲花药材中老鹳草素的含量比野生睡莲花药材中含量较高, 但两者之间其余成分含量相似, 无明显差异。表明利用栽培睡莲花药材可替代野生睡莲花药材进行临床使用。

表 6 各成分含量测定结果

Table 6 Results of content determination of various constituents (mg/g)

样品号 Sample No	没食子酸 Gallic acid		没食子酸甲酯 Methyl gallate		睡莲酚 Isostrictiniin		老鹳草素 Geraniin		鞣花酸 Ellagic acid		烟花苷 Nicotiflorin		1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 Pentagalloylglucose	
	ESM	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	
S1	0.974 8	8.738 3	8.598 5	4.550 7	4.648 7	28.225 7	28.369 0	2.545 2	2.534 9	2.552 9	2.522 9	19.035 2	18.826 3	
S2	0.757 4	6.762 6	6.828 0	4.852 5	5.000 6	23.341 1	23.554 5	1.953 0	1.929 6	1.375 4	1.434 4	14.463 3	14.411 1	
S3	0.625 0	6.943 5	7.019 9	4.846 5	5.048 2	23.523 9	23.830 0	1.683 0	1.660 6	0.668 1	0.772 3	15.962 0	16.128 7	
S4	0.757 1	8.472 8	8.610 3	5.555 8	5.656 0	25.154 7	25.455 3	1.934 7	1.909 2	2.295 1	2.306 6	19.571 7	19.581 7	
S5	0.712 3	8.610 4	8.901 6	5.309 2	5.445 5	22.588 3	22.637 6	1.826 2	1.800 6	0.532 9	0.636 9	19.359 6	19.449 4	
S6	0.637 8	7.243 0	7.433 9	4.187 6	4.203 1	19.294 0	19.588 9	1.551 7	1.514 2	0.459 0	0.569 8	19.296 0	19.499 9	
S7	0.624 0	8.568 8	8.619 8	4.049 2	4.174 8	26.563 3	26.667 1	1.869 3	1.859 8	1.819 1	1.875 7	16.645 9	16.803 7	
S8	0.614 2	8.353 3	8.389 3	3.659 5	3.705 0	22.584 1	22.635 4	1.639 4	1.612 4	1.958 6	2.011 8	18.154 8	18.369 5	
S9	0.597 7	8.394 7	8.448 6	3.682 4	3.732 8	21.494 7	21.406 2	1.507 2	1.471 1	2.851 8	2.874 0	18.644 7	18.899 2	
S10	0.693 0	8.679 7	8.781 5	3.999 0	4.098 3	21.124 5	21.315 7	1.867 5	1.845 6	1.717 1	1.766 1	20.589 4	20.707 9	

续表 6(Continued Tab. 6)

样品号 Sample No	没食子酸 Gallic acid		没食子酸甲酯 Methyl gallate		睡莲酚 Isostrictiniin		老鹳草素 Geraniin		鞣花酸 Ellagic acid		烟花苷 Nicotiflorin		1,2,3,4,6-五没 食子酰葡萄糖 Pentagalloylglucose	
	ESM	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	
S11	0.716 3	8.252 0	8.201 9	4.137 1	4.127 0	22.092 2	22.224 1	1.755 6	1.724 1	2.233 4	2.256 9	22.590 2	22.729 8	
S12	0.642 2	8.545 8	8.692 6	3.875 9	4.007 7	21.443 6	21.494 8	1.522 0	1.483 3	2.792 9	2.809 8	20.579 9	20.831 5	
S13	0.587 5	7.864 2	7.884 3	3.596 7	3.663 7	23.621 0	23.356 1	1.717 5	1.705 2	2.275 3	2.327 1	17.904 7	18.199 8	
S14	0.530 7	6.340 8	6.528 7	3.197 1	3.305 3	26.180 0	26.304 7	1.702 3	1.701 7	0.311 1	0.434 2	14.278 8	14.573 1	
S15	0.634 1	8.575 0	8.620 9	3.557 6	3.500 5	19.317 3	19.320 6	1.496 7	1.455 2	2.312 1	2.347 4	24.381 5	24.715 4	
S16	0.857 7	6.758 4	6.771 7	5.635 5	5.792 4	9.934 8	9.874 0	1.369 7	1.295 0	2.341 0	2.334 3	16.739 8	16.599 6	
S17	1.039 3	12.396	112.475 4	3.376 0	3.632 3	11.774 1	11.303 6	2.233 7	2.196 3	0.299 7	0.3627	5.977 6	5.566 4	

3 讨论与结论

本实验中 15 批栽培雪白睡莲花均为二代自繁种源,分别于 2021 年 5 月至 2021 年 8 月期间采收于不同土壤环境的各个栽培池,引种时间包括 2017 至 2020 年,由于伊犁地区的雪白睡莲花生长环境受到较大破坏,多次前往寻找发现原生长雪白睡莲花的区域已经干涸,直到在 2021 年 6 月仅采集到少量的野生雪白睡莲花,故引种源主要来自于新疆博斯腾湖和阿勒泰地区。2 批野生雪白睡莲花分别是在 2021 年 6 月和 9 月采自伊犁河谷的不同流域。

一测多评法不仅可以用来对多个成分进行质量控制,还能解决对照品紧缺和检测成本过高的问题,是中药进行含量测定和质量控制的热点方法和发展方向^[14,15]。然而,仅以化学成分为评价指标难以满足民族药质量控制的需求。目前,指纹图谱与一测多评法相结合是中药质量控制的常用手段,该法避免了仅以含量来评价药材质量好坏的弊端^[16,17]。本文构建了睡莲花的指纹图谱,指认并确定了没食子酸、没食子酸甲酯、睡莲酚、老鹳草素、鞣花酸、烟花苷和 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的色谱峰。17 批睡莲花药材之间成分以及含量大致相同,且并无较大差异,与对照指纹图谱相似度结果均大于 0.9。然而,2 批市售睡莲花药材与对照指纹图谱的相似度仅为 0.568 和 0.730。此外,有文献通过 DNA 条形码研究报道了市售睡莲花与白睡莲和柔毛齿叶睡莲的高度相似^[13],本文的研究结果也证实了这一点。本质量分析方法可从定性、定量两方面来评价睡莲花药材的质量,可提升睡莲花药材的质量标准,规范其来源,并对睡莲花药材的开发应用提供参考数据。

参考文献

- Zhang MH, Ji ZH, Ma X, et al. Study on HPLC fingerprint of Uygur medicine Zukamu Granules [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2018, 33:164-167.
- Guo YX, Dong HJ, Zhao J, et al. Effects of total flavonoids from *Nymphaea candida* on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51:4983-4990.
- Dong HJ, Guo YX, Liu T, et al. Preventive effect of total flavonoids from *Nymphaea candida* on CCl₄ induced hepatic fibrosis in mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32:1754-1760.
- Zhang SL, You SF, Xu F, et al. Preventive effect of total flavonoids from *Nymphaea candida* on CCl₄ induced acute liver injury in mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28:2017-2020.
- Zhao J, Tuersunmaimaiti M, Ji TF, et al. Hepatoprotective activity of isostrictiniin from *Nymphaea candida* on Con A-induced acute liver injury in mice [J], Nat Prod Res, 2021, 35:1662-1666.
- Liu DD, Luo J, Zhu YX, et al. Optimal extraction process and therapeutic effect studies of total flavonoids from *Nymphaea candida* on mice model of straphylococcus aureus mastitis [J]. Chin J Vet Sci (中国兽医学报), 2022, 42:566-575.
- Ma JF, Zhang SL, Lv MX, et al. Protective effect of nicotiflorin from *Nymphaea candida* on D-Gal-induced acute liver injury in mice [J]. Carcinog Teratogenesis Mutagen (癌变·畸变·突变), 2017, 29:370-378.
- Maierdan T, Liu T, Li CY, et al. Preventive effect of isostrictiniin from *Nymphaea candida* on acute liver injury induced by CCl₄ in mice and its antioxidant activities *in vitro* [J]. J Xinjiang Med Univ (新疆医科大学学报), 2018, 41:321-325.
- Zhao J, Xu F, Ji TF, et al. Studies on phenolic compounds

- from buds of *Nymphaea candida* Presl[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 916-918.
- 10 Zhao J, Yan M, He JH, et al. FlavonoL glycosides from the flowers of *Nymphaea candida* [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2008, 25: 115-117.
- 11 Liu YM. Uygur Medicine(维吾尔药志) [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology and Health Publishing House, 1999: 541.
- 12 Compilation of the Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Drug Standards of the Ministry of Health of the People's Republic of China; Uygur Drug Branch(国家药典委员会中华人民共和国卫生部药品标准: 维吾尔药分册) [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology and Health Publishing House, 1999: 41.
- 13 Liu XQ, Chen YF, Mei ZN, et al. Study on original plant and quality control of Uygur medicine *Nymphaeae Flos* [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2020, 27: 59-63.
- 14 Hu RX, Liang YH, Xu WL, et al. Application and research progress of QAMS in traditional Chinese medicine [J]. J Pharm Anal(药物分析杂志), 2019, 39: 1968-1979.
- 15 Qin KM, Yang B, Cai BC, et al. Application status and thinking of quantitative analysis of multi-components by single marker in quality control of multi-components traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49: 725-731.
- 16 Wang X, Qin Y, Wang DJ, et al. Progress of application in quality control of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2016, 38: 395-402.
- 17 Huang JY, Huang ZF, Hu XX, et al. Determination on the content of four coumarin in Yao medicine *Pileostegia tomentella* by QAMS [J]. Chin Med Mater(中药材), 2022, 45: 917-921.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周文	胡友财	袁涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiang	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		