

· 药学基础 ·

## 维吾尔族药睡莲花中多种活性成分同步测定的 质量控制方法建立

陈两绵<sup>1,2</sup>, 祖里皮亚·塔来提<sup>1</sup>, 玉素甫江·艾力<sup>1</sup>, 李建梅<sup>1</sup>, 霍仕霞<sup>1\*</sup>, 高慧敏<sup>2</sup>, 王智民<sup>2</sup>  
(1. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 乌鲁木齐 830011;  
2. 中国中医科学院 中药研究所 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 针对睡莲花质量控制指标选择较为单一、整体质量控制水平较低等问题, 建立睡莲花中多种活性成分同步测定的质量控制方法。方法: 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)鉴别并选择质量控制指标, 色谱条件为流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~2 min, 3%~8%B; 2~4 min, 8%~10%B; 4~13 min, 10%~15%B; 13~19 min, 15%~20%B; 19~26 min, 20%~45%B), 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 350 nm; 质谱条件为电喷雾离子源, 负离子扫描模式, 离子源温度 120 °C, 扫描范围 *m/z* 100~1 200, 低能量扫描时传输碰撞能量 6 eV, 高能量扫描时传输碰撞能量 25~50 eV。采用高效液相色谱法(HPLC)建立睡莲花多指标成分同步测定的质量控制方法, 流动相 0.2% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~30 min, 12%~15%B; 30~60 min, 15%~22%B; 60~90 min, 22%~40%B), 检测波长 350 nm; 含量测定的供试品溶液制备方法为加 80 倍量 70% 甲醇水浴回流 60 min。结果: 通过对样品中主要成分的保留时间、紫外吸收特征、一级和二级质谱信号与对照品进行比对, 从睡莲花中定性鉴别出短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁、烟花苷、紫云英苷、槲皮素、槲皮素-3-甲基醚和山柰酚 8 种含量较高的活性成分, 选择其作为质量控制指标。在建立的 HPLC 条件下, 上述 8 种成分均能达到基线分离(分离度>1.5), 其质量浓度分别在 1.99~99.6、1.76~176、1.52~75.8、3.60~180、0.964~96.4、1.18~118、1.94~96.8、1.04~104 mg·L<sup>-1</sup> 与峰面积呈良好线性关系(*r*=0.999 9), 检测限 10~49 μg·L<sup>-1</sup>, 定量限 34~164 μg·L<sup>-1</sup>; 平均回收率 97.12%~103.1%, 相对标准偏差(RSD) 1.1%~2.2%。结论: 建立了睡莲花中多种活性成分同步测定的质量控制方法, 该方法简便、准确、重复性良好, 可为睡莲花的质量标准制订提供科学依据, 并为含睡莲花的维吾尔族医院制剂向新药转化奠定研究基础。

**[关键词]** 睡莲花; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS); 定性分析; 高效液相色谱法(HPLC); 方法学考察; 酚酸; 黄酮类

[中图分类号] R22;R28;R931;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)09-0202-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220755 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220809.1745.003.html>

[网络出版日期] 2022-08-11 15:16:56

### Establishment of A Quality Control Method for Simultaneous Determination of Multiple Active Components in Uyghur Medicine of *Nymphaeae Flos*

CHEN Liangmian<sup>1,2</sup>, TALAITI Zulipiya<sup>1</sup>, AILI Yusufujiang<sup>1</sup>, LI Jianmei<sup>1</sup>,  
HUO Shixia<sup>1\*</sup>, GAO Huimin<sup>2</sup>, WANG Zhimin<sup>2</sup>

(1. Xinjiang Institute of Traditional Uighur Medicine, Urumqi 830011, China;

2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Materia Medica,  
Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a quality control method for the simultaneous determination of

[收稿日期] 2022-06-17

[基金项目] 新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项(WJWY-202225); 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2022D01A127); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费项目(KY2021061)

[第一作者] 陈两绵, 博士, 副研究员, 从事中药药效物质基础及质量评价研究, Tel: 010-84014128, E-mail: lmchen@icmm.ac.cn

[通信作者] \* 霍仕霞, 研究员, 从事中药民族药药效物质基础研究和创新药物的研发, Tel: 0991-2565663, E-mail: 273932681@qq.com

multiple active components in Nymphaeae Flos aiming at the problems of the single index for quality control and the relatively low overall quality control level. **Method:** Ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to identify and select the index components for quality control with the mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) for gradient elution (0-2 min, 3%-8%B; 2-4 min, 8%-10%B; 4-13 min, 10%-15%B; 13-19 min, 15%-20%B; 19-26 min, 20%-45%B) at a flow rate of  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , detection wavelength of 350 nm, electrospray ionization (ESI), negative ion scanning mode, ion source temperature of  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , scanning range of  $m/z$  100-1 200, transmit collision energy of 6 eV for low-energy scanning and 25-50 eV for high-energy scanning. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to establish the quality control method for the simultaneous determination of multi-index components with the mobile phase of 0.2% phosphoric acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) for gradient elution (0-30 min, 12%-15%B; 30-60 min, 15%-22%B; 60-90 min, 22%-40%B) and detection wavelength of 350 nm. The preparation method of the test solution for content determination was refluxing extraction for 60 min with 80 times the amount of 70% methanol. **Result:** By comparing the retention time, ultraviolet absorption characteristics, MS and MS/MS spectrometric signals in the samples with the reference substances, 8 active components with high contents, including breviolincarboxylic acid, ellagic acid, rutin, nicotiflorin, astragaln, quercetin, quercetin-3-methylether and kaempferol, were identified qualitatively from Nymphaeae Flos, which were selected as the index components for quality control. Under the established HPLC conditions, the above 8 components could be well separated (resolution > 1.5), and showed good linearity ( $r=0.999\ 9$ ) between the concentration ranges of 1.99-99.6, 1.76-176, 1.52-75.8, 3.60-180, 0.964-96.4, 1.18-118, 1.94-96.8, 1.04-104  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and the peak areas, respectively. The detection limits of them were 10-49  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the limits of quantitation were 34-164  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The average recoveries were 97.12%-103.1% with the relative standard deviations (RSDs) were 1.1%-2.2%. **Conclusion:** A quality control method for simultaneous determination of the multiple active components in Nymphaeae Flos have been developed, which is simple, accurate and reproducible, and it can provide a scientific basis for the formulation of quality standard of this herb and lay a research foundation for the transformation of Uygur hospital preparations containing Nymphaeae Flos into new drugs.

**[Keywords]** Nymphaeae Flos; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS); qualitative analysis; high performance liquid chromatography (HPLC); methodological investigation; phenolic acids; flavonoids

睡莲花具有降热止咳、益心护脑、安神止痛和祛乃孜来的功效,主要用于治疗感冒发热、头痛咳嗽、心悸不安和咽痛解毒等<sup>[1]</sup>,为维吾尔族医(以下简称“维医”)习用药材,维吾尔族药(以下简称“维药”)名内鲁帕尔,是祖卡木颗粒、降热比那甫西糖浆、理血奇朗糖浆和炎消迪娜尔糖浆等常用维药复方制剂的主要药味。睡莲花主要分布于我国新疆伊犁、阿勒泰和博湖地区<sup>[2]</sup>,具有抗氧化<sup>[3-4]</sup>、抑菌抗炎<sup>[5]</sup>、保肝<sup>[6-7]</sup>和降血糖<sup>[8]</sup>等生物活性,在功能性食品、医药和化妆品等行业具有广泛的应用前景。

睡莲花中主要含有水溶性多酚和黄酮类成分,其中水溶性多酚主要为鞣花酸、isostroictiniin、老鹳草素、1,2,3,4,6-五没食子酰基葡萄糖等没食子鞣质类成分<sup>[9-10]</sup>。黄酮类成分主要为槲皮素、山柰酚、

芦丁、烟花苷、紫云英苷等黄酮醇及其苷类化合物<sup>[11-13]</sup>。据现有文献报道,睡莲花总黄酮对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和链球菌等奶牛乳腺炎主要致病菌均具有抑制作用<sup>[14]</sup>,对四氯化碳诱导的小鼠和大鼠肝纤维化具有保护作用<sup>[15-16]</sup>,可以明显降低乳腺炎模型小鼠乳腺组织中的金黄色葡萄球菌数量、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和白细胞介素-6含量,明显减少炎症细胞和红细胞的数量<sup>[17]</sup>。目前,对于睡莲花的药效物质基础研究尚停留在单体化合物的提物分离,以及总提物或总黄酮部位的药效学研究方面,研究基础较为薄弱;对于睡莲花的质量控制和评价,部颁标准中仅有基原、性状和显微鉴别项,无相关检查项和含量测定项,现行法定标准低<sup>[1]</sup>。由于睡莲花中的水溶性多酚结构复杂多变、稳定性

差、分离难度高,对其他黄酮类成分的色谱分离会造成干扰,给睡莲花多成分同步测定的质量控制方法建立带来了较大困难。因此,现有文献采用高效液相色谱法(HPLC)建立睡莲花的定量分析方法时,仅选择没食子酸、烟花苷或紫云英苷等其中1~2个成分作为质量控制指标<sup>[18-20]</sup>,整体质量控制水平较低,难以准确反映其内在质量。

基于此,本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对睡莲花中的主要成分进行定性分析,选择一些成分作为质量控制指标,采用HPLC建立这些成分同步测定的质量控制方法,为睡莲花的质量标准体系完善提供科学依据,并为含睡莲花的维吾尔族医院制剂向新药转化奠定基础。

## 1 材料

ACQUITY UPLC/Xevo G2-S QToF型液质联用系统(美国 Waters 公司),LC-2030C 3D型高效液相色谱仪(日本岛津公司),FW-10型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器有限公司),SQP PRACTUM 224-1CN型万分之一电子天平、SQP QUINTIX 35-1CN型十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),CA-1111型冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司)。

芦丁、槲皮素、鞣花酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为100080-201811、100081-201610、111959-201903,纯度均>98%),短叶苏木酚酸、烟花苷、紫云英苷、槲皮素-3-甲基醚、山柰酚对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号分别为CHB201214、CHB190102、CHB181115、CHB201102、CHB190127,纯度均>98%),水为娃哈哈蒸馏水,乙腈、甲酸和磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。收集睡莲花样品合计7批,其中3批购自新疆麦迪森药业有限公司饮片分公司(批号H30195619、H30195616、H30195621),2批次购自新疆维草集药材有限公司(批号Y2004020、Y2008012),2批次购自新疆维吾尔药业股份有限公司(批号19112301、20181220),均经新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所闫明研究员鉴定为睡莲科雪白睡莲 *Nymphaea candida* 的干燥花蕾。

## 2 方法与结果

### 2.1 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的质量控制指标鉴别与选择

#### 2.1.1 色谱条件

采用Kromasil UPLC C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相0.1%甲酸水溶

液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~2 min, 3%~8%B; 2~4 min, 8%~10%B; 4~13 min, 10%~15%B; 13~19 min, 15%~20%B; 19~26 min, 20%~45%B),流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长350 nm,进样量2.0 μL。

#### 2.1.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),负离子扫描模式,毛细管电压2.0 kV,锥孔电压40 V,补偿电压80 V,离子源温度120℃,脱溶剂气温度450℃,脱溶剂气氮气流量600 L·h<sup>-1</sup>,锥孔气流量50 L·h<sup>-1</sup>,采用MS<sup>E</sup>模式采集棒状图,扫描范围 *m/z* 100~1 200,扫描间隔0.5 s,低能量扫描时传输碰撞能量6 eV,高能量扫描时传输碰撞能量25~50 eV;选择1.0 ng·L<sup>-1</sup>亮氨酸脑啡肽进行质量实时校正,流速10 μL·min<sup>-1</sup>,数据采集由软件MassLynx 4.1控制。

#### 2.1.3 对照品溶液的制备

精密称取短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁、烟花苷、紫云英苷、槲皮素、槲皮素-3-甲基醚、山柰酚对照品适量,加70%甲醇制成适宜质量浓度的对照品储备溶液。分别取上述对照品储备溶液适量,加70%甲醇制成上述8个成分质量浓度分别为60.2、34.5、40.1、38.7、30.8、45.2、55.4、62.3 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

#### 2.1.4 供试品溶液的制备

取睡莲花粉末(过40目筛,下同)约0.25 g,置于具塞锥形瓶中,加入70%甲醇20 mL,超声提取40 min(500 W, 53 kHz),摇匀,滤过,取续滤液,即得。

#### 2.1.5 定性鉴别

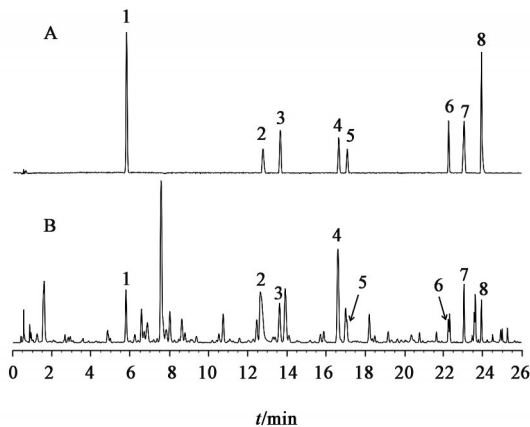
按2.1.1和2.1.2项下条件对供试品溶液和混合对照品溶液进行分析,对供试品中主要成分的保留时间(*t<sub>R</sub>*)、紫外吸收特征、一级和二级质谱信号与混合对照品进行比对分析,化合物信息详见表1、基峰色谱图(BPI)见图1。结果从睡莲花中定性鉴别出短叶苏木酚酸和鞣花酸2种水溶性多酚,以及山柰酚、槲皮素、槲皮素-3-甲基醚、芦丁、烟花苷和紫云英苷6种黄酮醇及其苷类化合物,这8种化合物的结构式见增强出版附加材料。据报道,鞣花酸和短叶苏木酚酸具有抗氧化、抗炎抑菌、抗肿瘤等生理活性<sup>[21-23]</sup>;芦丁、烟花苷、紫云英苷、山柰酚、槲皮素和槲皮素-3-甲基醚具有抗炎、抗氧化、保肝和神经保护等药理作用<sup>[12,24-26]</sup>。因此,选择上述8种含量较高的活性成分作为质量控制指标性成分较为合适。

由表1可知,短叶苏木酚酸的准分子离子 *m/z* 291.014 7 [M-H]<sup>-</sup>依次脱去CO<sub>2</sub>、2CO、H<sub>2</sub>O和CO,分别获得 *m/z* 247、191、173、145的特征碎片离子,其可能裂解途径见增强出版附加材料;鞣花酸准分子

表1 睡莲花中主要化学成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS鉴别

Table 1 Identification of main components in *Nymphaeae Flos* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	$t_R$ /min	$\lambda_{max}$ /nm	$[M-H]^-$ $m/z$ 实测值	$\delta$ /ppm	分子式	化合物	特征碎片离子 $m/z$ ( $\delta$ /ppm)
1	5.80	221, 277, 355	291.014 7	2.1	$C_{13}H_8O_8$	短叶苏木酚酸	247.024 9(2.4), 191.034 4(0.0), 173.023 9(0.0), 145.029 1(0.7)
2	12.66	253, 368	300.998 7	1.0	$C_{14}H_6O_8$	鞣花酸	245.008 4(-0.8), 229.013 7(0.0), 201.018 1(-3.5)
3	13.64	255, 354	609.146 5	1.5	$C_{27}H_{30}O_{16}$	芦丁	300.027 4(-0.7), 271.024 0(-1.1), 255.029 3(0.0), 151.003 2(0.7)
4	16.61	265, 349	593.150 8	0.3	$C_{27}H_{30}O_{15}$	烟花苷	284.032 7(0.4), 255.029 2(-0.4), 227.035 0(2.6), 151.003 4(2.0)
5	17.07	265, 349	447.092 9	0.4	$C_{21}H_{20}O_{11}$	紫云英苷	284.032 4(-0.7), 255.029 4(0.4), 227.034 4(0.0), 151.002 7(-2.6)
6	22.25	255, 369	301.034 6	-0.7	$C_{15}H_{10}O_7$	槲皮素	271.024 0(-1.1), 255.029 3(0.0), 151.003 0(-0.7)
7	23.06	255, 355	315.050 8	1.0	$C_{16}H_{12}O_7$	槲皮素-3-甲基醚	300.026 9(-2.3), 271.024 7(1.5), 255.029 5(0.8), 151.003 3(1.3)
8	23.95	265, 366	285.039 7	-0.7	$C_{15}H_{10}O_6$	山柰酚	255.029 8(2.0), 227.034 4(0.0), 151.003 4(2.0)



注: A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 短叶苏木酚酸; 2. 鞣花酸; 3. 芦丁; 4. 烟花苷; 5. 紫云英苷; 6. 槲皮素; 7. 槲皮素-3-甲基醚; 8. 山柰酚(图2同)

图1 睡莲花UPLC-Q-TOF-MS/MS分析的BPI

Fig. 1 BPI of *Nymphaeae Flos* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

离子  $m/z$  300.998 7  $[M-H]^-$  分别脱去  $C_2O_2$ 、 $C_2O_3$  和  $C_3O_4$ , 得到  $m/z$  245、229、201 的特征碎片离子。芦丁和槲皮素-3-甲基醚分别脱去芸香糖基和甲基, 获得槲皮素特征离子  $m/z$  300(准分子离子脱H), 槲皮素进一步裂解, 获得  $m/z$  271、255、151 的特征碎片离子; 烟花苷和紫云英苷分别脱去芸香糖基和葡萄糖基(Glu), 获得山柰酚的特征离子  $m/z$  284(准分子离子脱H), 山柰酚进一步裂解, 获得  $m/z$  255、227、151 的特征碎片离子。以紫云英苷为例, 其准分子离子  $m/z$  447.092 9  $[M-H]^-$  脱去 Glu+H, 获得  $m/z$  284 的特征碎片离子, 再依次脱去 CO+H、CO 和  $C_6H_4$ , 获得  $m/z$  255、227、151 的特征碎片离子, 其可能的裂解途径见增强出版附加材料。

## 2.2 HPLC定量分析方法的建立

**2.2.1 色谱条件** Phenomenex  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相0.2%磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~30 min, 12%~15%B; 30~60 min,

15%~22%B; 60~90 min, 22%~40%B), 柱温 30  $^{\circ}C$ , 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 350 nm, 进样量 10  $\mu$ L。在上述条件下, 各成分在 90 min 内均能达到基线分离, 分离度均>1.5, 拖尾因子约 1.00, 见图2。

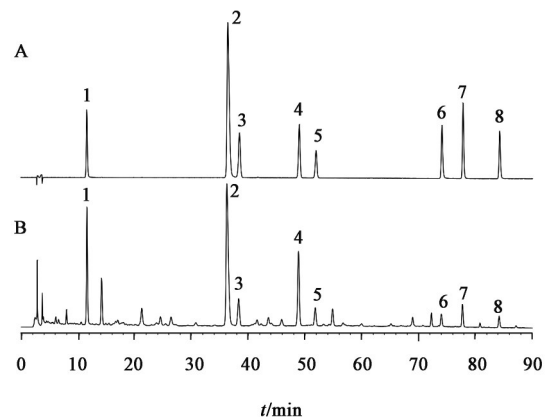


图2 睡莲花的HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Nymphaeae Flos*

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取短叶苏木酚酸、芦丁、烟花苷、槲皮素-3-甲基醚对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇使溶解并稀释至刻度, 得质量浓度分别为 0.498、0.379、0.899、0.484 g·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液; 取上述对照品储备液各 2.0 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 得 1 号混合对照品溶液。将 1 号混合对照品溶液分别稀释 2、5、10、20、50 倍, 制得 2~6 号混合对照品溶液。精密称取鞣花酸、紫云英苷、槲皮素、山柰酚对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇使溶解并稀释至刻度, 制成质量浓度分别为 0.880、0.482、0.588、0.518 g·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液; 取上述对照品储备液各 2.0 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 得 7 号混合对照品溶液。将 7 号混合对照品溶液分别稀释 2、10、20、40、100 倍, 制得 8~12 号

混合对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取睡莲花粉末(批号H30195619)约0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇20 mL,称定质量,分别采用水浴回流40 min、超声40 min(500 W, 53 kHz)和冷浸18 h进行样品提取,处理结束后放置至室温,称定质量,加70%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液,按2.2.1

项下条件测定,见表2。结果发现与超声、冷浸比较,水浴回流的提取效率最佳,尤其对短叶苏木酚酸和鞣花酸的影响最为显著,故提取方法选择水浴回流。取睡莲花粉末约0.25 g,分别加40%甲醇、70%甲醇和甲醇水浴回流40 min,按上述方法制备供试品溶液,按2.2.1项下条件测定,见表2。结果发现与40%甲醇和甲醇比较,70%甲醇对8种成分的整体提取效率最佳,故选择70%甲醇为提取溶剂。

表2 不同因素对睡莲花中8种成分含量的影响(n=2)

因素	水平	质量分数								8种成分总量
		短叶苏木酚酸	鞣花酸	芦丁	烟花苷	紫云英苷	槲皮素	槲皮素-3-甲基醚	山柰酚	
提取方法	水浴回流	1.47	7.40	1.01	2.60	0.59	0.15	0.32	0.078	13.6
	超声	1.32	5.62	0.96	2.53	0.58	0.14	0.32	0.075	11.6
	冷浸	1.34	5.51	0.98	2.56	0.58	0.14	0.32	0.076	11.5
提取溶剂	40% 甲醇	1.67	4.92	1.00	2.56	0.58	0.05	0.19	0.022	11.0
	70% 甲醇	1.46	7.24	0.99	2.56	0.58	0.15	0.31	0.076	13.4
	甲醇	1.15	5.84	0.85	2.42	0.56	0.13	0.31	0.076	11.3
提取时间	20 min	1.42	7.24	1.00	2.58	0.59	0.14	0.32	0.077	13.4
	40 min	1.46	7.38	0.99	2.56	0.58	0.15	0.31	0.076	13.5
	60 min	1.52	7.52	1.00	2.61	0.59	0.16	0.32	0.079	13.8
	90 min	1.58	7.55	1.01	2.63	0.60	0.16	0.32	0.079	13.9
溶剂用量	60倍	1.51	6.87	0.99	2.60	0.58	0.15	0.31	0.075	13.1
	80倍	1.52	7.52	1.00	2.61	0.59	0.16	0.32	0.079	13.8
	100倍	1.52	7.65	1.00	2.61	0.59	0.16	0.32	0.077	13.9
	120倍	1.55	7.88	1.02	2.63	0.60	0.16	0.32	0.079	14.2

取睡莲花粉末约0.25 g,分别加70%甲醇水浴回流20、40、60、90 min,按上述方法制备供试品溶液,按2.2.1项下条件测定,见表2。结果发现提取时间对短叶苏木酚酸和鞣花酸的提取效率影响较大,随着提取时间的增加,其含量逐步提高,从降低能耗和提高工作效率的角度,选择提取时间60 min。取睡莲花粉末约0.25 g,选择70%甲醇为提取溶剂,溶剂用量分别为60、80、100、120倍,按上述方法制备供试品溶液,按2.2.1项下条件测定,见表2。结果发现当溶剂用量分别为80、100、120倍时,8种成分整体提取效率的差异无统计学意义,从节省溶剂和降低能耗的角度,选择溶剂用量为80倍。综上分析,确定供试品溶液的制备方法为取睡莲花粉末约0.25 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇20 mL,称定质量,水浴回流60 min,放置至室温,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.2.4 线性范围考察** 取2.2.2项下1~12号混合对照品溶液,按2.2.1项下条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得各成分回归方程,见表3;取6号和12号混合对照品溶液,逐级稀释,进样分析并记录峰面积,按信噪比(S/N)=3和S/N=10分别计算检测限(LOD)和定量限(LOQ),见表3。

**2.2.5 精密度试验** 取短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁、烟花苷、紫云英苷、槲皮素、槲皮素-3-甲基醚和山柰酚质量浓度分别为9.96、5.40、7.58、18.0、7.88、8.54、9.68、6.74 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液,按2.2.1项下条件连续进样6次,计算上述8种成分峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为0.2%、0.8%、0.5%、0.2%、0.1%、0.2%、0.2%、0.3%,表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取睡莲花粉末(批号H30195619)约0.25 g,精密称定,按2.2.3项下方法

表3 睡莲花中8种成分的线性范围考察

Table 3 Examination of linear ranges of eight components in *Nymphaeae Flos*

成分	回归方程	线性范围 /mg·L <sup>-1</sup>	LOD /μg·L <sup>-1</sup>	LOQ /μg·L <sup>-1</sup>
短叶苏木酚酸	$Y=2.43 \times 10^4 X - 1.03 \times 10^3$	1.99~99.6	12	40
鞣花酸	$Y=1.51 \times 10^4 X - 1.51 \times 10^4$	1.76~176	49	164
芦丁	$Y=1.54 \times 10^4 X - 1.01 \times 10^3$	1.52~75.8	31	102
烟花苷	$Y=1.52 \times 10^4 X - 3.03 \times 10^3$	3.60~180	25	83
紫云英苷	$Y=1.97 \times 10^4 X + 1.34 \times 10^3$	0.964~96.4	20	68
槲皮素	$Y=2.91 \times 10^4 X - 4.46 \times 10^3$	1.18~118	17	56
槲皮素-3-甲基醚	$Y=3.25 \times 10^4 X - 6.45 \times 10^3$	1.94~96.8	10	34
山柰酚	$Y=2.82 \times 10^4 X - 2.42 \times 10^3$	1.04~104	12	42

注:r均为0.999 9

制备供试品溶液,分别于制备后0、5、12、17、36、48 h按2.2.1项下条件测定,计算短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁、烟花苷、紫云英苷、槲皮素、槲皮素-3-甲基醚和山柰酚峰面积的RSD分别为1.3%、0.3%、0.5%、0.1%、1.9%、0.5%、0.7%、0.4%,表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取睡莲花粉末(批号H30195619)约0.25 g,精密称定,平行6份,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下条件测定,

表4 睡莲花样品中8种成分含量(n=2)

Table 4 Contents of eight components in *Nymphaeae Flos* (n=2)

批号	8种成分含量							
	短叶苏木酚酸	鞣花酸	芦丁	烟花苷	紫云英苷	槲皮素	槲皮素-3-甲基醚	山柰酚
H30195619	1.53	7.48	1.01	2.60	0.58	0.16	0.32	0.079
H30195616	1.39	7.47	0.98	2.00	0.45	0.15	0.27	0.069
H30195621	1.65	7.20	0.91	1.72	0.29	0.13	0.19	0.053
Y2004020	1.45	7.79	0.66	2.13	0.56	0.14	0.40	0.13
Y2008012	1.82	7.57	1.19	2.92	0.57	0.23	0.35	0.21
19112301	1.30	5.90	1.09	1.89	0.37	0.12	0.18	0.053
20181220	0.82	5.50	0.82	2.64	0.74	0.083	0.20	0.057

### 3 讨论

对于研究基础较为薄弱的药材,定性鉴别其内在的主要活性成分,是建立质量控制方法的前提和基础。UPLC-Q-TOF-MS/MS结合了色谱的强分离性能和高分辨质谱的强定性性能,可快速发现和鉴别药材的成分,有助于药效物质的发现和建立<sup>[27-29]</sup>。本文采用UPLC-Q-TOF-MS/MS从睡莲花中鉴别出了短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁

计算短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁、烟花苷、紫云英苷、槲皮素、槲皮素-3-甲基醚和山柰酚的平均质量分数分别为1.53、7.48、1.01、2.60、0.58、0.16、0.32、0.079 mg·g<sup>-1</sup>,RSD分别为1.0%、1.1%、0.6%、0.3%、1.8%、1.0%、0.5%、1.1%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收试验 取睡莲花粉末(批号H30195619)约0.125 g,平行6份,精密称定,分别按样品中量与加入量约1:1比例加入对照品溶液,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下条件测定,计算短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁、烟花苷、紫云英苷、槲皮素、槲皮素-3-甲基醚和山柰酚平均加样回收率为97.12%~103.1%,RSD 1.1%~2.2%,表明该方法准确度良好,详细数据见增强出版附加材料。

2.2.9 样品测定 取不同批次的睡莲花样品,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下条件测定,计算样品中8种成分的含量,见表4。结果发现短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁、烟花苷、紫云英苷、槲皮素、槲皮素-3-甲基醚和山柰酚在7批样品中的平均质量分数分别为1.42、6.99、0.95、2.27、0.51、0.14、0.27、0.093 mg·g<sup>-1</sup>,RSD分别为22.2%、12.9%、18.4%、19.8%、29.5%、31.2%、31.8%、62.6%,表明睡莲花中上述8种成分的含量存在较大差异。因此,建立上述8种成分同步测定的质量控制方法,有利于睡莲花的整体质量控制和评价。

等8种含量较高的活性成分,并选择其作为质量控制指标,但除了短叶苏木酚酸和鞣花酸外,睡莲花中还存在其他的没食子鞣质类成分,尚有待进一步研究。同时,由于没食子鞣质结构复杂多变、稳定性差、干扰性强,当采用HPLC建立多成分同步测定的定量分析方法时,目标成分的色谱分离较难达到理想的分离效果。此外,有文献采用液质联用技术对睡莲花中没食子酸、没食子酸甲酯、烟花苷和槲

皮素4种成分进行了定量分析<sup>[30]</sup>。但相较于HPLC,采用液质联用技术进行定量分析,不仅成本较高,而且准确度和重复性较差。故对于药材而言,在建立定量分析方法时,能采用HPLC则应该尽量避免使用液质联用技术。本研究通过系统的色谱条件摸索,最终获得了适宜的HPLC条件,可实现上述8种成分的同时测定。

通过对短叶苏木酚酸、鞣花酸、芦丁等8种成分的紫外全波长扫描发现,短叶苏木酚酸在221、277、355 nm处有最大吸收,其他7种成分分别在250~270 nm和340~370 nm处有最大吸收。综合考虑目标成分和干扰杂质的紫外吸收特征,选择350 nm作为HPLC定量分析的检测波长最为合适。预试验考察了3种品牌色谱柱(Phenomenex C<sub>18</sub>、VP-ODS C<sub>18</sub>和Kromasil C<sub>18</sub>)对睡莲花中8种成分的分离效果,结果显示,采用VP-ODS C<sub>18</sub>和Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱时,短叶苏木酚酸、鞣花酸和芦丁的色谱峰拖尾现象较为明显,且鞣花酸和芦丁之间难以达到基线分离,而采用Phenomenex C<sub>18</sub>色谱柱,上述8种成分均能达到基线分离,分离度均>1.5,拖尾因子约1.00,故选择Phenomenex C<sub>18</sub>色谱柱作为定量分析用色谱柱。预试验还考察了水-乙腈、0.2%甲酸水溶液-乙腈和0.2%磷酸水溶液-乙腈3种洗脱系统的分离效果,结果显示,以纯水作为水相时,短叶苏木酚酸和鞣花酸不成峰,其他黄酮类成分出峰时间滞后且存在诸多杂质干扰;以0.2%甲酸水溶液作为水相时,出峰时间整体提前,鞣花酸和芦丁之间难以达到基线分离,且槲皮素的色谱峰存在杂质干扰;以0.2%磷酸水溶液作为水相时,通过梯度洗脱程序的进一步优化,8种成分均能达到较为理想的分离效果,故流动相选择0.2%磷酸水溶液-乙腈洗脱系统。对于短叶苏木酚酸和鞣花酸等酚酸类成分,流动相pH及酸的类型对于色谱分离效果的影响最为关键。

对于供试品溶液的制备,水浴回流、超声和冷浸3种提取方法对短叶苏木酚酸和鞣花酸的提取效率影响最大,且水浴回流的提取效率显著高于超声和冷浸提取。采用不同比例甲醇(40%甲醇、70%甲醇和甲醇)作为提取溶剂时,短叶苏木酚酸含量随甲醇体积分数的升高而降低,鞣花酸含量随着甲醇体积分数的升高先升高后降低,芦丁、烟花苷和紫云英苷的含量受甲醇体积分数的影响不明显;而对于槲皮素、槲皮素-3-甲基醚和山柰酚,70%甲醇和甲醇的提取效率远高于40%甲醇。综上分析,选择70%甲醇作为提取溶剂最为合适。此外,从降低能

耗和提高工作效率的角度,提取时间选择60 min,溶剂用量选择80倍。

睡莲花作为维医习用药材,常用于治疗感冒发热、头痛咳嗽、心悸不安和咽痛解毒等,是木尼孜其塞甫拉合剂、复方卡森子露、复方克比热提片(丸)和复方赛比尔片(丸)等维吾尔族医院制剂的处方药味,这些医院制剂临床应用时间长、疗效确切。目前,国家鼓励基于临床人用经验的中药民族药的新药研发,尽管如此,由于睡莲花存在基原不清晰、药效物质基础尚不明确、质量控制方法简单、现行法定标准低等诸多问题,极大地制约了上述医院制剂向新药的转化。因此,进一步明确睡莲花的基原和药效物质基础、建立准确可靠的质量控制方法、修订睡莲花的现行法定标准,已成为其当前亟待解决的问题和痛点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:111.
- [2] 刘勇民,沙吾提·伊克木. 维吾尔药志:下[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:541.
- [3] 宋杰,郭子雨,姚雨含,等. 睡莲多酚提取工艺优化及其抗油脂氧化作用[J]. 中国粮油学报,2021,36(10):149-153,195.
- [4] 莫晓宁,李艾,余启明,等. 睡莲多糖的超声波提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 粮食科技与经济,2019,44(4):91-94.
- [5] 刘丹丹,罗洁,向薇薇,等. 雪白睡莲花粗提物对奶牛乳房炎主要致病菌体外抑菌和抗炎作用[J]. 动物医学进展,2021,42(7):17-21.
- [6] ZHAO J, LIU T, MA L, et al. Antioxidant and preventive effects of extract from *Nymphaea candida* flower on *in vitro* immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures[J]. Evid-Based Compl Alt Med,2011,2011:497673.
- [7] 王雪,杨巧丽,赵军,等. 睡莲花提取物对小鼠实验性肝损伤的保护作用研究[J]. 中药材,2015,38(1):139-142.
- [8] 游风,孟晋武,肖迪,等. 3种新疆产药材的降血糖作用研究[J]. 畜牧与兽医,2021,53(7):117-121.
- [9] 赵军,徐芳,吉腾飞,等. 雪白睡莲花酚类成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(7):916-918.
- [10] 朱萱萱,白璐,刘晓谦,等. 近十年来中药鞣质的研究进展[J]. 中国中药杂志,2021,46(24):6353-6365.
- [11] 赵军,贺金华,闫明,等. 维药睡莲花化学成分研究

- [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1232-1234.
- [12] LIU R N, WANG W, DING Y, et al. A new flavonol glycoside and activity of compounds from the flower of *Nymphaea candida*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2007, 9(3/5): 333-338.
- [13] 赵军, 闫明, 贺金华, 等. 维药睡莲花中的黄酮醇苷类成分分析[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(2): 115-117.
- [14] 张伟, 朱怡萱, 彭菲, 等. 雪白睡莲花活性成分对奶牛乳腺炎主要致病菌抑菌和抗炎作用研究[J]. 动物医学进展, 2022, 43(6): 63-68.
- [15] 郭羽轩, 董惠娟, 刘涛, 等. 睡莲花总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 中草药, 2020, 51(19): 4983-4990.
- [16] 董惠娟, 郭羽轩, 王鑫, 等. 睡莲花总黄酮对CCl<sub>4</sub>致小鼠肝纤维化的保护作用[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(10): 1754-1760.
- [17] 刘丹丹, 罗洁, 朱怡萱, 等. 雪白睡莲花总黄酮提取工艺优化及其对金黄色葡萄球菌性小鼠乳腺炎模型的治疗效果[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(3): 566-575.
- [18] 盛萍, 帕丽达·阿不力孜, 张烜, 等. 维吾尔药睡莲花中烟花苷的含量测定[J]. 中药材, 2006, 29(12): 1313-1314.
- [19] 李洁, 雪佳, 李柯翱, 等. HPLC测定维药睡莲花中没食子酸和烟花苷含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(8): 92-94.
- [20] 买吾拉江·阿不都热衣木, 李倩, 王亮, 等. HPLC法测定睡莲花中烟花苷和紫云英苷的含量[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(20): 20-22.
- [21] 王佳鸾, 赵俸艺, 张春红, 等. 鞣花酸提取、纯化及其生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 416-424.
- [22] PERUMAL V, KHATIB A, AHMED Q U, et al. Antioxidants profile of *Momordica charantia* fruit extract analyzed using LC-MS-QTOF-based metabolomics [J]. Food Chem (Oxf), 2021, 2: 100012.
- [23] 陈欣霞, 张丽艳, 万金志, 等. 高速逆流色谱同时分离头花蓼中的没食子酸和短叶苏木酚酸[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 1957-1960.
- [24] 李珂如, 胡光强, 吴安国, 等. 山奈酚及其衍生物在神经系统疾病中的药理作用研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(4): 412-416.
- [25] ZHAO J, ZHANG S L, YOU S P, et al. Hepatoprotective effects of nicotiflorin from *Nymphaea candida* against concanavalin A-induced and D-galactosamine-induced liver injury in mice[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): 587.
- [26] DOK-GO H, LEE K H, KIM H J, et al. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*[J]. Brain Res, 2003, 965(1/2): 130-136.
- [27] 余意, 康利平, 郝庆秀, 等. 饮片巴戟天、巴戟肉和盐巴戟天主要化学成分的含量差异分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(2): 146-152.
- [28] 陈两绵, 刘晓谦, 张永欣, 等. 茶藨子叶状层菌中核苷类成分的UPLC-Q-TOF-MS定性分析和HPLC含量测定[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(12): 2912-2922.
- [29] 郭宁, 赵雍, 孙奕, 等. 朱砂莲中马兜铃酸类成分的UPLC-QTOF-MS/MS定性与定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 162-170.
- [30] 李洁, 丁文欢, 樊珍珍, 等. 高效液相色谱联用质谱法对睡莲花中4种成分的鉴定和含量测定[J]. 中南药学, 2021, 19(10): 2139-2143.

[责任编辑 刘德文]