

一测多评法同时测定荷叶中4种生物碱含量

陈强,张华,沙玫,刘永静*
(福建中医药大学药学院,福建福州350122)

摘要: 目的 采用高效液相色谱法,建立同时测定荷叶中N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、荷叶碱、莲碱4种生物碱含量的一测多评法。方法 采用高效液相色谱法,荷叶碱为内标,分别建立荷叶碱与N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、莲碱的相对校正因子,计算荷叶中N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、莲碱的含量,实现一测多评。同时采用外标法测定荷叶中4种生物碱类成分的量,并将计算结果与一测多评法进行比较。色谱柱为Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-水-三乙胺-冰醋酸(49:49.2:1.25:0.48);检测波长为270 nm;流速为1 mL/min;柱温为30℃;进样量为10 μL。结果 荷叶中的N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、荷叶碱、莲碱分别在0.020 9~0.418 4 μg($r=1.000 0$),0.010 0~0.199 2 μg($r=1.000 0$),0.019 7~0.393 6 μg($r=0.999 9$),0.007 8~0.156 8 μg($r=1.000 0$)范围内呈良好的线性关系;平均回收率($n=6$)分别为101.16%、98.73%、101.06%、95.95%,RSD值分别为1.93%、1.75%、1.33%、2.00%。结论 以荷叶碱为内标同时测定N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、莲碱的一测多评法可用于荷叶的定量分析。

关键词: 荷叶;一测多评;荷叶碱;N-去甲基荷叶碱;O-去甲基荷叶碱;莲碱

中图分类号:R284.2 文献标志码:A 文章编号:1000-338X(2020)06-0029-04

DOI:10.13260/j.cnki.jfjtc.012126

荷叶(*Folium Nelumbinis*)为睡莲科植物莲(*Nelumbo nucifera Gaertn.*)的干燥叶,被《中华人民共和国药典(一部)》^[1](2015年版)收录,主要用于暑热烦渴、暑湿泄泻、脾虚泄泻、血热吐衄、便血崩漏等^[1]。荷叶化学成分复杂多样,主要含有生物碱、黄酮、鞣质、有机酸等有效成分^[2]。大量研究表明:荷叶具有多种药理作用,例如降脂减肥、降糖、抑菌和抗氧化^[3]等。近年来的研究更进一步表明:荷叶生物碱类化合物是荷叶降脂减肥功效的主要生物活性物质^[4],是一种具有广阔开发前景的植物来源的减肥资源,但是现阶段对于荷叶生物碱的质量控制大多数是以单一荷叶生物碱的含量作为指标,单一生物碱的含量不能完全反映生物碱的特征。一测多评法是利用中药有效成分内在函数关系和比例关系,只测定一个成分(对照品可得到者)实现多个成分(对照品难以得到或难供应)的同步测定,具有检测成本低、分析效率高等优点。本实验采用HPLC法同时测定了荷叶中N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、荷叶碱和莲碱的含量,并以荷叶碱为内标物,利用以上4种生物碱类成分内在的函数和比例关系,得出N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、莲碱与荷叶碱之间的相对校正因子 f_R ^[5-6],建立同时测定4种生物碱的一测多评法^[7-12],为荷叶药材多指标定量测定提供一种新的分析模式。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 U-3000 高效液相色谱仪和 UV 检测器(美国 DIONEX 公司);XS105 型电子天平(梅特勒-

托利多仪器有限公司);KQ-500E 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 N-去甲基荷叶碱对照品(纯度≥98%,南京森贝伽生物科技有限公司,批号:16062601);O-去甲基荷叶碱对照品(纯度≥95%,上海源叶生物科技有限公司,批号:M17M 9556201);莲碱对照品(纯度≥98.0%,成都普思生物科技有限公司,批号:PS010846);荷叶碱对照品(纯度≥98%,上海源叶生物科技有限公司,批号:W03J8Z27223);甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(分析纯,西陇化工有限公司);Milipore 超纯水、三乙胺(分析纯,西陇化工有限公司);冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。荷叶药材产自湖南,购自江西樟树天齐堂中药饮片有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取N-去甲荷叶碱、O-去甲荷叶碱、荷叶碱和莲碱4种对照品各5.23、4.98、4.92、1.96 mg,分别置10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即为对照品储备液;精密吸取上述对照品储备液N-去甲荷叶碱、O-去甲荷叶碱、荷叶碱和莲碱各1.0、0.5、1.0、1.0 mL至25 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取荷叶药材粗粉约0.1 g,精密称定,精密加入10 mL甲醇,超声30 min,滤过,精密吸取续滤液1 mL,再加1 mL甲醇稀释,混匀,过0.45 μm有机相膜,即得供试品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙

收稿日期:2020-08-05

基金项目:福建省科技厅引导性项目(2018Y0051)

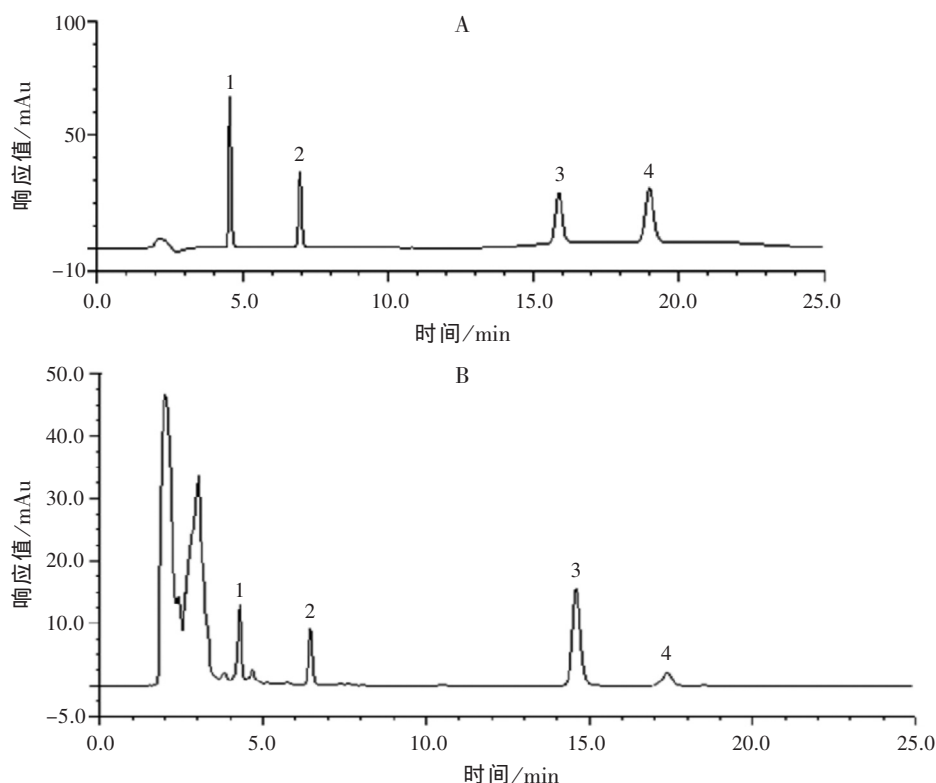
作者简介:陈强(1995—),女,硕士研究生,主要从事中药分析研究。

通信作者:刘永静(1983—),女,副教授。E-mail:24168425@qq.com

腈-水-三乙胺-冰醋酸(49:49.2:1.25:0.48);检测波长为 270 nm;流速为 1 mL/min;柱温为 30 °C;进样量为 10 μ L。

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μ L,

在上述色谱条件下进样分析。拖尾因子在 0.95 ~ 1.05,理论塔板数以荷叶碱计大于 2 000。混合对照品溶液、供试品溶液 HPLC 图见图 1。



注:A 混合对照品溶液;B 供试品溶液。1 N-去甲基荷叶碱;2 O-去甲基荷碱;3 荷叶碱;4 莲碱。

图 1 混合对照品溶液、供试品溶液 HPLC 图

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密吸取空白溶剂 10 μ L,在上述色谱条件下进样分析。结果显示空白溶剂在对照品色谱峰相应位置处未见色谱峰,方法专属性良好。

2.3.2 标准曲线的建立 取混合对照品溶液,分别精密进样 1、2、5、10、20 μ L,以对照品的质量(μ g)为横坐标,峰面积为纵坐标,建立荷叶中 4 个生物碱成分定量的标准曲线。实验结果表明各成分在各自范围内呈现良好的线性关系,结果见表 1。

表 1 4 种生物碱线性回归方程

化合物	回归方程	线性范围/ μ g	回归系数
N-去甲基荷叶碱	$y = 30.634x$	0.020 9~0.418 4	1.000 0
O-去甲基荷碱	$y = 43.285x - 0.012 7$	0.010 0~0.199 2	1.000 0
荷叶碱	$y = 31.352x - 0.001 9$	0.019 7~0.393 6	0.999 9
莲碱	$y = 40.073x - 0.019 6$	0.007 8~0.156 8	1.000 0

2.3.3 仪器精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,计算 N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷碱、荷叶碱和莲碱的峰面积的 RSD,分别为 1.8%、1.3%、0.4%、1.2%($n = 6$),结果表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批荷叶药材粉末 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”色谱条件分别进样分析,分别计算 4 个化合物的平均含量及其 RSD。结果显示,荷叶药材中 N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷碱、荷叶碱和莲碱的质量分数平

均值分别为 0.15%、0.06%、0.30%、0.04%,RSD 值分别为 1.6%、1.0%、0.3%、0.9%($n = 6$)。结果表明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 分别精密称取已知含量(N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷碱、荷叶碱和莲碱的含量分别为 0.14%、0.07%、0.28%、0.04%)的荷叶药材粉末约 0.05 g,共 6 份,分别精密加入适量 N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷碱、荷叶碱和莲碱对照品储备液 150、50、300、100 μ L,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”色谱条件分别进样分

析,测定峰面积,计算 N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、荷叶碱和莲碱的含量,求得平均回收率。见表 2。结果显示:N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、

荷叶碱和莲碱的平均回收率分别为 101.16%、98.73%、101.06%、95.95%,RSD 值分别为 1.93%、1.75%、1.33%、2.00%。结果表明该实验的准确度良好。

表 2 4 种生物碱回收率

化合物	取样量/g	样品含量/ μg	标准品取样量/ μg	测得总量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
N-去甲基荷叶碱	0.050 5	70.70	78.45	151.98	103.61	101.16	1.93
	0.050 1	70.14	78.45	148.53	99.92		
	0.050 6	70.84	78.45	151.39	102.68		
	0.050 2	70.28	78.45	149.21	100.62		
	0.050 4	70.56	78.45	147.65	98.26		
	0.050 3	70.42	78.45	150.32	101.84		
O-去甲基荷叶碱	0.050 5	35.35	24.90	59.38	96.50	98.73	1.75
	0.050 1	35.07	24.90	59.57	98.40		
	0.050 6	35.42	24.90	59.57	97.00		
	0.050 2	35.14	24.90	60.21	100.67		
	0.050 4	35.28	24.90	60.25	100.29		
	0.050 3	35.21	24.90	59.99	99.51		
荷叶碱	0.050 5	141.40	147.60	293.79	103.24	101.06	1.33
	0.050 1	140.28	147.60	289.60	101.16		
	0.050 6	141.68	147.60	291.09	101.23		
	0.050 2	140.56	147.60	287.27	99.40		
	0.050 4	141.12	147.60	288.56	99.89		
	0.050 3	140.84	147.60	290.53	101.42		
莲碱	0.050 5	20.20	19.60	38.88	95.33	95.95	2.00
	0.050 1	20.04	19.60	39.30	98.28		
	0.050 6	20.24	19.60	38.91	95.28		
	0.050 2	20.08	19.60	38.35	93.21		
	0.050 4	20.16	19.60	38.88	95.51		
	0.050 3	20.12	19.60	39.34	98.08		

2.4 相对校正因子的确定

2.4.1 待测组分相对校正因子的计算 根据一测多评法的原理,假设某样品中含有多个组分,选取其中 1 个组分 k 为内标,建立组分 k 与其他组分 m 之间的相对校正因子: $f_{km} = f_k/f_m = (W_k \times A_m)/(W_m \times A_k)$,由此可以导出定量计算公式: $W_m = (W_k \times A_m)/(f_{km} \times A_k)$,式中: A_k 为内参物峰面积, W_k 为内参物浓度, A_m 为其他组分 m 峰面积, W_m 为其他组分 m 浓度。

选择荷叶碱为内标成分,分别计算 O-去甲基荷叶碱、N-去甲基荷叶碱和莲碱的相对校正因子,结果见表 3。由表 3 可知,N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱和莲碱的 f_R 值分别为 0.99、1.37、3.16。

2.4.2 相对校正因子重现性考察 首先,分别考察了岛津 LC2030、戴安 U-3000 2 个品牌的高效液相色谱仪对相对校正因子的影响,分别精密吸取各浓度混合对照品溶液 10 μL ,利用上述两种仪器进行进样分析,计算各个校正因子。结果表明不同的高效液相色谱仪对相对校正因子影响较小。

其次,在同一高效液相色谱仪(戴安 U-3000)上,

考察 3 种不同色谱柱(Diamonsil C_{18} 、Hypersil ODS、Phenomenex C_{18})对荷叶中 3 个生物碱类成分相对校正因子的影响。结果表明不同的色谱柱对相对校正因子的影响无显著差异。

表 3 3 种生物碱类成分 f_R

对照品	$f_{\text{荷叶碱}/\text{N-去甲基荷叶碱}}$	$f_{\text{荷叶碱}/\text{O-去甲基荷叶碱}}$	$f_{\text{荷叶碱}/\text{莲碱}}$
1 μL	1.01	1.37	3.17
2 μL	1.00	1.37	3.18
5 μL	0.99	1.38	3.20
10 μL	0.98	1.37	3.06
20 μL	0.98	1.38	3.20
平均值	0.99	1.37	3.16
RSD/%	1.49	0.36	1.85

2.5 一测多评法与外标法测定结果比较 取不同产地的荷叶药材,按照实验中供试品溶液制备的方法制备待测溶液,按照实验要求准确吸取各待测溶液 10 μL ,分别注入高效液相色谱仪,并按实验步骤“2.1”项中所列色谱条件进行测定,分别采用传统外标法与一测多评法计算各产地荷叶中的含量,

结果见表 4。外标法实测值与一测多评法计算的质量分数值相对误差 < 3%, 认为 2 种测定方法测得的

荷叶生物碱含量无显著性差异, 说明一测多评法在荷叶 4 种生物碱类成分含量测定研究中是可行的。

表 4 一测多评与外标法测定结果比较

%

序号	荷叶碱含量/%	N-去甲基荷叶碱含量			O-去甲基荷叶碱含量			莲碱含量		
		外标法	一测多评法	相对误差	外标法	一测多评法	相对误差	外标法	一测多评法	相对误差
1	0.290 5	0.129 7	0.128 7	-0.77	0.057 3	0.056 5	-1.4	0.037 2	0.037 8	1.6
2	0.329 7	0.147 8	0.148 2	0.27	0.063 3	0.062 6	-1.1	0.041 8	0.041 0	-1.9
3	0.284 8	0.134 8	0.134 0	-0.59	0.056 5	0.057 2	1.2	0.036 0	0.035 6	-1.1

3 讨 论

荷叶碱是荷叶生物碱的主要特征性成分之一, 作为《中华人民共和国药典(一部)》^[1](2015 年版) 荷叶质量评价的成分, 其对照品也容易获得, 因此本实验选用荷叶碱作为内参物。采用一测多评法和外标法测定的荷叶生物碱含量比较无显著性差异, 说明在荷叶生物碱对照品短缺的情况下, 基本可以通过测定荷叶中荷叶碱含量来计算其他 3 种生物碱类成分的含量。一测多评法可以应用到荷叶中生物碱含量测定中, 建立相对校正因子, 不仅节约时间及对照品资源, 且测定结果也比较准确。

本研究对于荷叶中 4 种生物碱含量的测定方法, 与《中华人民共和国药典(一部)》^[1](2015 年版) 荷叶生物碱的测定方法相比, 符合中药多成分的特点, 有利于中药质量控制的整体性和客观性, 更符合中药质量控制方法的要求, 对荷叶及其相关产品的质量控制在重要意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 275.
[2] 周健鹏. 荷叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 天津药学, 2014, 26(2): 65-68.

- [3] 邢峰丽, 封小强, 刘伟花, 等. 荷叶的药理作用研究概述[J]. 环球中医药, 2016, 9(1): 115-118.
[4] 范婷婷. 荷叶生物碱类物质降脂减肥活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 21-28.
[5] 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.
[6] 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.
[7] 蔡洪鲲, 蒋范任, 钟胜佳, 等. 一测多评法同时测定钩藤中 4 种生物碱的含量[J]. 中南药学, 2019, 17(11): 1937-1940.
[8] 罗婷, 王佳琪, 江宇勤, 等. 一测多评法测定不同产地黄柏炭中 4 种生物碱含量[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(8): 1357-1364.
[9] 陈建维, 刘圆, 刘晟楠, 等. 一测多评法测定枳实中 4 种黄酮类成分[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1374-1377.
[10] 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.
[11] 李晶, 陈超, 文萍, 等. 一测多评法测定枇杷止咳软胶囊中硫酸吗啡和磷酸可待因的含量及其应用拓展[J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(6): 67-70.
[12] 张云丽, 张岱松, 纪文岩, 等. 一测多评法同时测定通脉降浊软胶囊中 6 种成分的含量[J]. 中医药导报, 2019, 25(10): 58-62.

Simultaneous Determination of Four Alkaloids in *Nelumbinis Folium* by Quantitative Analysis of Multi-Components by Single Marker

CHEN Qiang, ZHANG Hua, SHA Mei, LIU Yongjing*

College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

ABSTRACT Objective: To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker method for simultaneous determination of four alkaloids contents of N-nornuciferine, O-nornuciferine, nuciferine and roemerine in *Nelumbinis Folium* by using HPLC. **Methods:** With nuciferine as an internal standard, the relative correction factors of N-nornuciferine, O-nornuciferine and roemerine were calculated respectively, and the contents of N-nornuciferine, O-nornuciferine and roemerine in *Nelumbinis Folium* were determined to achieve multiple evaluation by using HPLC. At the same time, the quantity of four alkaloids in *Nelumbinis Folium* was measured by external standard method, and the difference between calculated value and measured value was compared, so as to verify the scientific nature and feasibility of multi-evaluation method. The chromatographic separation was carried on Phenomenex C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) in isocratic elution with the mobile phase of acetonitrile-water-triethylamine-acetic acid (49:49.2:1.25:0.48). The detection wavelength was 270 nm; the flow rate was set at 1 mL/min; The column temperature was set at 30 °C; the sample size was 10 μL. **Results:** At concentrations ranging between 0.020 9-0.418 4 μg (r=1.000 0), 0.010 0-0.199 2 μg (r=1.000 0), 0.019 7-0.393 6 μg (r=0.999 9), 0.007 8-0.156 8 μg (r=1.000 0), peak area of N-nornuciferine, O-nornuciferine, nuciferine and roemerine showed good linear relationship, and the average recoveries (n=6) were 101.16% (RSD 1.93%), 98.73% (RSD 1.75%), 101.06% (RSD 1.33%), 95.95% (RSD 2.00%) respectively. **Conclusion:** The method of simultaneous determination of N-nornuciferine, O-nornuciferine and roemerine with nuciferine as internal standard by single marker can be used for quantitative analysis of *Nelumbinis Folium*.

KEY WORDS quantitative analysis of multi-components by single marker; *Nelumbinis Folium*; nuciferine; N-nornuciferine; O-nornuciferine; roemerine