

荷叶生物活性效应标志成分分析

田盛, 姜璐, 吴婷, 李勋章, 刘雅晴, 王海波*

(辽宁中医药大学药学院, 大连 116600)

摘要: **目的** 筛选荷叶生物活性效应标志成分, 为荷叶质量控制提供参考。**方法** 采用高效液相色谱法同时测定荷叶中 8 种黄酮或生物碱成分含量, 并对荷叶抗氧化、抑制脂肪酶活性效应与成分含量相关性进行分析。采用薄层色谱法分离分析荷叶特征色谱斑点, 聚类分析法筛选质量标志成分。**结果** 8 种成分含量在 0.61~9.93 mg/g 之间; 荷叶碱、N-去甲基荷叶碱和 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡可作为荷叶化学质量评价的备选标志成分; 抗氧化活性与金丝桃苷、荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、N-去甲基荷叶碱含量呈现正相关; 脂肪酶抑制率与 N-去甲基荷叶碱、金丝桃苷、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、荷叶碱呈现正相关; 薄层色谱法鉴别特征成分为 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、荷叶碱。**结论** 本研究确定荷叶碱、N-去甲基荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡和金丝桃苷为荷叶抗氧化、抑制脂肪酶活性效应和化学质量评价指标成分, 有助于全面评价荷叶药材质量及药效活性作用。

关键词: 荷叶; 生物效应成分; 荷叶碱; 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡

Analysis of biomarker components of lotus leaf bioactivity effect

TIAN Sheng, JIANG Lu, WU Ting, LI Xun-Zhang, LIU Ya-Qing, WANG Hai-Bo*

(Department of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: Objective To screen the bioactive effect marker components of lotus leaf and provide reference for the quality control of lotus leaf. **Methods** The content of 8 kinds of flavonoids or alkaloids in lotus leaves were determined by high performance liquid chromatography, and the correlations between the antioxidative and lipase inhibitory effects of lotus leaf and the content of the components were analyzed. The characteristic chromatographic spots of lotus leaf were separated and analyzed by thin-layer chromatography, and the quality marker components were screened by cluster analysis. **Results** The content of 8 kinds of components ranged from 0.61 to 9.93 mg/g. Nuciferine, N-demethylotone and 2-hydroxy-1-methoxy-apomorphine could be used as alternative markers for chemical quality evaluation of lotus leaf. The antioxidant activity was positively correlated with the content of hyperoside, nuciferine, 2-hydroxy-1-methoxyapomorphine and N-demethylotone, the inhibition rate of lipase was positively correlated with N-demethylotone, hyperin, 2-hydroxy-1-methoxy-apomorphine and nuciferine. The characteristic components of thin layer chromatography were 2-hydroxy-1-methoxy-lapomorphine and nuciferine.

基金项目: 辽宁省卫健委中药资源普查项目(2019006)、沈阳市科技局重点实验室项目(skf20174703)、大学生创新创业训练计划项目(X202010162057)

Fund: Supported by the Liaoning Provincial Health Commission Traditional Chinese Medicine Resources Survey Project (2019006), the Key Laboratory of Shenyang Science and Technology Bureau (skf20174703), and the College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (X202010162057)

*通信作者: 王海波, 博士, 教授, 主要研究方向为中药药效物质分析与质量评价研究。E-mail: whb_email@126.com

*Corresponding author: WANG Hai-Bo, Ph.D, Professor, Department of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China. E-mail: whb_email@126.com

Conclusion In this study, nuciferine, N-demethylotone, 2-hydroxy-1-methoxyapophine and hypericin were identified as the antioxidant, lipase inhibitory effect and chemical quality evaluation index components of lotus leaf, which will help to comprehensively evaluate the quality and efficacy of lotus leaf medicinal materials.

KEY WORDS: lotus leaf; biomarker components; nuciferine; 2-hydroxy-1-methoxy-laporphine

0 引言

荷叶为睡莲科植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的干燥叶, 味苦、性平, 归肝、脾、胃经, 具有清暑化湿、升发清阳、凉血止血的功效, 多用于治疗暑热烦渴、暑湿泄泻、便血崩漏等疾病^[1], 还具有降血脂^[2-7]、抗氧化^[8-13]、抗菌^[14]、抗病毒^[15-16]、抗衰老等作用。荷叶作为具有悠久使用历史的药食两用材料, 在中医临床治疗使用和健康产品开发应用等领域已有广泛应用。特别是近年来研究表明, 荷叶含有多种降脂减肥作用的活性成分, 是一种具有广阔开发前景的瘦身产品的天然原料。荷叶原料来源广泛, 质量差别较大。在质量控制评价指标方面, 中国药典(2020 年版)仅以荷叶碱作为含量测定项的质量控制指标。单一生物碱的含量不能完全反映荷叶中生物碱类活性成分的质量特征。而且, 荷叶中黄酮类成分也具有多种生物活性, 有研究提出增加黄酮类成分的含量控制指标^[17-18], 以利于全面控制荷叶质量, 保证作用效果。但因荷叶中生物碱类和黄酮类成分的色谱保留时间差别较大, 现有研究多是对黄酮成分或生物碱成分分别进行含量分析^[19-22], 共同测定研究报道较少。同时在荷叶的薄层色谱研究中, 对于特征成分的鉴别研究相对较少^[23-24]。

抗氧化活性是常用的健康产品功能评价指标^[25]。抑制脂肪酶活性是评价药物成分降脂减肥作用的主要指标^[26], 也可以间接反映荷叶化湿、升发清阳的功效作用。为全面评价荷叶药材质量、衡量样品生物活性作用效应情况, 本研究尝试将指标成分选择与成分含量、生物活性作用相关性进行整体评价。利用核壳固定相的高效分离能力, 对荷叶中 8 种生物碱、黄酮成分含量同时进行测定, 再结合荷叶药材的抗氧化、抗脂肪酶活性效应分析, 筛选出化学质量和生物活性标志成分, 以期为荷叶质量及生物活性效应评价提供研究支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦仪器有限公司); Welch BoltimateTM C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)、Acculab Alc-110.4 万分之一分析天平、CP225D 十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司); RPL-D200 柱温箱(大连日普利科技仪器有限公司); KQ5200-DB 数控超声波清洗器(昆

山市超声仪器有限公司); 2F-2C 型暗箱式自动紫外分析仪(上海市安亭电子仪器厂); DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

对照品儿茶素(纯度 99%)、金丝桃苷(纯度 98%)(成都曼斯特生物科技有限公司); 异槲皮苷(纯度 98%, 成都克洛玛生物科技有限公司); 槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷(纯度 98%)、荷叶碱(纯度 98%)、N-去甲基荷叶碱(纯度 98%)(四川萃益润生物科技有限公司); 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡(纯度 98%)、莲碱(纯度 98%)(四川维克奇生物科技有限公司); 丙酮(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 曲拉通 X-100、棕榈酸对硝基苯酯、脂肪酶、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(上海 Aladdin 公司); 冰乙酸(分析纯)、二氯甲烷(分析纯)、三氯甲烷(分析纯)(天津市凯信化学工业有限公司); 氨水(分析纯)、甲醇(色谱纯)、异丙醇(分析纯)(天津市科密欧化学试剂有限公司); 乙腈(色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂); 三乙胺(色谱纯, 上海阿拉丁试剂公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

10 批荷叶样品来源见表 1, 经辽宁中医药大学邸学高级实验师鉴定为睡莲科植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的干燥叶。

表 1 荷叶药材来源信息表
Table 1 Source information table of lotus leaf medicine

序号	来源	批号	序号	来源	批号
S1	山东	201105	S7	山东	210102CP254
S2	山东	20200801	S8	山东	200601CP254
S3	湖南	200301	S9	湖北	210415
S4	湖南	2020090381	S10	湖南	C140285
S5	山东	200601	S11	对照药材	121322-201805
S6	湖北	A201001			

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

(1) 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)样品前处理

取各样品粉末(过 3 号筛)约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇溶液 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声提取 1 h, 静置冷却后再称定质量, 用甲醇溶液补足减失

的重量,摇匀,用0.22 μm 微孔滤膜滤过,备用。

(2)薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)样品前处理

取不同来源的荷叶药材,粉碎,过3号筛,精密称定粉末1 g,加入浓氨试液1 mL浸润,加入二氯甲烷40 mL,超声处理30 min,过滤,滤液回收溶剂至干,残渣加甲醇1 mL溶解,备用。

1.2.2 对照品溶液配制

(1)HPLC混合对照品溶液的配制

分别取儿茶素、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、金丝桃苷、异槲皮苷、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、N-去甲基荷叶碱、荷叶碱、莲碱对照品适量,精密称定,精密加入适量甲醇溶解,分别制成每1 mL含1.0 mg的对照品储备溶液。再分别吸取各对照品储备溶液适量,混合,加甲醇稀释并定容,制成每1 mL含儿茶素、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、金丝桃苷、异槲皮苷、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、N-去甲基荷叶碱、荷叶碱、莲碱0.060、0.150、0.100、0.080、0.020、0.045、0.075、0.015 mg的混合对照品溶液,备用。

(2)TLC混合对照品溶液的配制

取2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、荷叶碱对照品储备溶液适量,混合,加甲醇稀释并定容,制成每1 mL含2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、荷叶碱分别为0.3、0.6 mg的混合对照品溶液,备用。

1.3 测定方法

1.3.1 HPLC色谱条件

流动相乙腈(A)-水(含0.1%冰乙酸和0.2%三乙胺)(B),梯度洗脱,0~20 min,10%~18% A;20~26 min,18% A;26~33 min,18%~19% A;33~45 min,19%~30% A;45~50 min,30%~35% A,流速:0.4 mL/min,进样量:5 μL ,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长270 nm。

1.3.2 荷叶清除自由基活性测定

参考文献[27]并稍做修改,取1.5 mL DPPH溶液,加入1.5 mL 1.2.1(1)项下荷叶样品溶液混合,置暗处避光反应30 min后,于517 nm处测定各吸光度。样品空白对照后,计算自由基清除率。

DPPH自由基清除率计算公式为:清除率/%=[1-(A_2-A_3)/ A_1]*100%。实验以1.5 mL甲醇和1.5 mL DPPH溶液为空白对照组,所测吸光度值为 A_1 。以1.5 mL DPPH和1.5 mL荷叶提取物为样品组,所测吸光度值为 A_2 。以1.5 mL荷叶提取物溶液加1.5 mL甲醇为样品试剂空白组,所测吸光度值为 A_3 。

1.3.3 荷叶抑制脂肪酶活性测定

酶活性测定方法参考ZHU等^[28]文献,并做适当修改。取0.08 mg/mL脂肪酶0.1 mL,取1.2.1(1)项荷叶甲醇提取物0.1 mL,与0.9 mL C液(棕榈酸对硝基苯酯、异丙醇、曲拉通、PBS(pH 8.0,0.1 mol/L))置于5 mL EP管,40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应20 min,反应结束后立即加入2 mL无水乙醇,离心

取上清液,于410 nm处测定吸光度。空白对照后,计算抑制率。

抑制率计算公式为:抑制率/%=[1-(A_3-A_4)/(A_1-A_2)]*100%。实验以酶50 μL ,甲醇50 μL 为空白对照组,测定吸光度值为 A_1 ,以PBS 50 μL ,甲醇50 μL 为底物试剂空白组,测定吸光度值为 A_2 ,以酶50 μL ,荷叶甲醇提取物50 μL 为样品组,测定吸光度值为 A_3 ,以PBS 50 μL ,荷叶甲醇提取物50 μL 为样品试剂空白组,测定吸光度值为 A_4 。

1.3.4 TLC分析方法

按照《中国药典》项下薄层色谱鉴别方法(通则0502)试验,吸取上述供试品溶液及对照药材溶液各10 μL ,混合对照品溶液5 μL ,点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-丙酮-浓氨(6:2:0.1, V:V:V)为展开剂,展开,取出、晾干,置于碘缸中,待斑点清晰时取出,日光灯下检视,拍照。

1.4 数据处理

数据分析采用Excel、SPSS 22.0,绘图软件采用Origin 2018。

2 结果与分析

2.1 HPLC方法学考察及含量测定

2.1.1 HPLC色谱图

按照1.3.1项下色谱条件对荷叶药材及混合标准溶液进行测定,色谱图见图1。色谱显示样品中各成分分离度较好。

2.1.2 线性关系

取混合对照品溶液适量,逐级稀释成8个不同倍数的混合对照品溶液,按1.3.1项下色谱条件测定,以峰面积(Y)为纵坐标,质量(X, μg)为横坐标绘制标准曲线,8个成分在各自质量范围内线性关系良好。线性关系考察结果见表2。

2.1.3 精密度试验

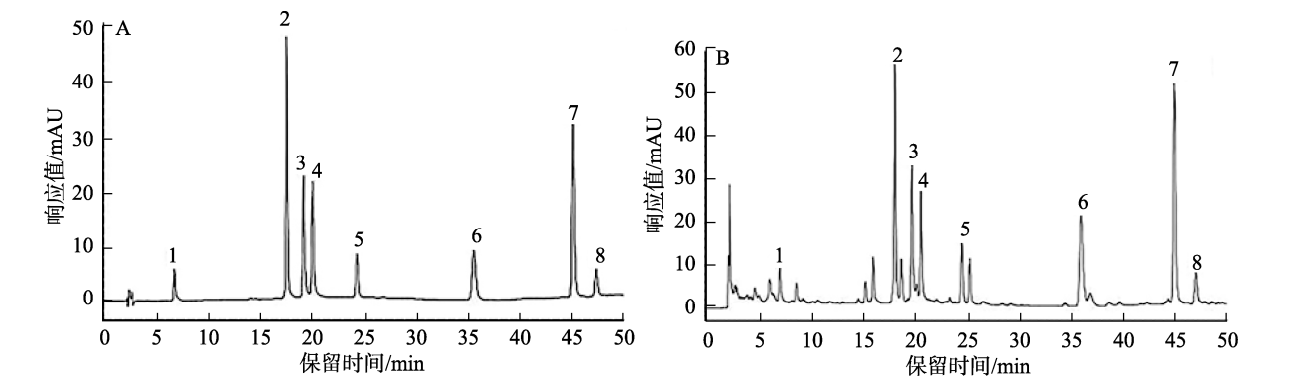
取S6样品按照1.2.1(1)项下方法制备供试品溶液,连续进样6次,记录峰面积,计算得到8种成分峰面积的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)在1.23%~2.66%间,表明仪器精密度好。

2.1.4 稳定性试验

取S6样品按照1.2.1(1)项下方法制备供试品溶液,室温放置,分别于0、2、4、6、8、10 h按照1.4.1项下方法进行测定,记录峰面积,计算得到8种成分峰面积的RSDs在1.62%~2.84%间,表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验

取S6荷叶药材粉末6份,按照1.2.1(1)项下方法制备供试品溶液,按照1.3.1项下方法进行测定,计算得到8种成分含量的RSDs在1.40%~2.84%间,表明方法重复性良好。



注: 1. 儿茶素; 2. 槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷; 3. 金丝桃苷; 4. 异槲皮苷; 5. 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡; 6. N-去甲基荷叶碱; 7. 荷叶碱; 8. 莲碱。

图 1 混合对照(A)及荷叶样品(B)色谱图
Fig.1 Chromatograms of mixed reference (A) and lotus leaf sample (B)

表 2 线性关系表
Table 2 Table of linear relation

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
儿茶素	$Y=902.24X-3.086$	0.9997	0.0075~0.3000
槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	$Y=2173.7X-10.742$	0.9998	0.01875~0.75000
金丝桃苷	$Y=1987.6X+17.535$	0.9991	0.00125~0.50000
异槲皮苷	$Y=2562.7X-9.848$	0.9995	0.01~0.40
2-羟基-1-甲氧基阿朴啡	$Y=4177.2X+0.9329$	0.9992	0.0025~0.1000
N-去甲基荷叶碱	$Y=3549X+1.8906$	0.9999	0.005625~0.225000
荷叶碱	$Y=4915.3X-8.1797$	0.9997	0.009375~0.375000
莲碱	$Y=4213.7X-1.0785$	0.9995	0.001875~0.075000

2.1.6 加样回收率实验

取 S6 的荷叶药材供试品 6 份, 每份 0.125 g, 精密称定, 分别精密加入儿茶素(1 mg/mL) 288 μL 、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷(1 mg/mL) 655 μL 、金丝桃苷(1 mg/mL) 865 μL 、异槲皮苷(1 mg/mL) 395 μL 、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡(1 mg/mL) 140 μL 、N-去甲基荷叶碱(1 mg/mL) 290 μL 、荷叶碱(1 mg/mL) 540 μL 、莲碱(1 mg/mL) 35 μL , 精密加入甲醇补足至 25.00 mL, 再按照 1.2.1 项下方法制备供试品溶液, 按照 1.3.1 项下方法进行测定, 计算得到 8 种成分加样回收率在 93.79%~104.29%之间, RSDs 均小于 2.80%。

2.1.7 实际样品测定

取 10 批不同来源的荷叶样品, 按照 1.2.1 项下方法制备供试品溶液, 按照 1.3.1 项下方法进行测定, 记录峰面积, 并计算含量。8 种成分含量见表 3。

由结果可知, 不同来源荷叶样品中各种成分含量差异较大。荷叶药材黄酮类中槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷含量最高, 为(9.93 $\pm$ 3.06) mg/g, 生物碱类成分以荷叶碱含量最高, 为(2.48 $\pm$ 1.80) mg/g。黄酮类成分中异槲皮苷含量最大相差 0.9 倍, 生物碱类成分 N-去甲基荷叶碱含量最大相差达 29.7 倍。

2.1.8 成分含量相关性分析

为分析 8 种成分在荷叶样品化学质量评价方面的指标性作用, 先赋予 8 种成分相同的权重系数, 以成分含量最高值为参照(设分值 100), 计算其他样品中相应成分对应分值, 将 8 种成分总分值作为该样品的综合评分值。采用软件 SPSS 22.0 对 10 批荷叶样品中 8 个成分含量的评分进行相关性分析, 结果见表 4。

结果表明, 荷叶碱、N-去甲基荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、金丝桃苷、儿茶素与综合评分呈现极显著正相关($P<0.01$)。提示荷叶碱、N-去甲基荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡和金丝桃苷可作为荷叶化学质量评价的标志成分。

2.2 荷叶生物活性评价

2.2.1 自由基清除率与荷叶成分含量相关性分析

精密吸取不同来源荷叶样品的供试品溶液, 分别稀释为 0.33 mg/mL, 按 1.3.2 项下方法进行测定。测得荷叶 S1-S10 的自由基清除率分别为 90%、87%、85%、95%、75%、94%、74%、84%、24%、63%。采用软件 SPSS 22.0 对 10 批荷叶样品中 8 种成分含量和自由基清除率进行相关性分析, 结果见表 5。

表 3 荷叶药材成分含量表(mg/g)
Table 3 Table of ingredients content of lotus leaf medicine (mg/g)

序号	儿茶素	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	金丝桃苷	异槲皮苷	2-羟基-1-甲氧基阿朴啡	N-去甲基荷叶碱	荷叶碱	莲碱
S1	3.67	7.90	5.88	3.76	0.92	3.68	4.61	0.90
S2	3.71	14.21	0.67	5.68	0.29	0.15	1.01	0.72
S3	2.68	13.77	0.78	5.71	0.47	0.15	1.12	0.63
S4	2.53	5.37	7.94	3.72	1.12	2.61	5.30	0.39
S5	0.62	10.73	0.58	3.24	0.32	0.19	1.50	1.01
S6	2.39	5.09	6.86	3.15	1.05	2.37	4.74	0.29
S7	1.13	11.30	2.75	4.42	0.65	0.74	2.07	0.71
S8	1.93	10.40	3.13	4.93	0.71	0.94	2.94	0.66
S9	1.07	10.43	0.64	4.63	0.37	0.13	0.97	0.57
S10	0.95	10.13	0.51	4.54	0.20	0.12	0.53	0.45
S11	2.69	10.81	5.66	5.95	2.16	3.14	4.53	0.41
均值±SD	2.07±1.12	9.93±3.06	2.97±2.90	4.38±0.91	0.61±0.33	1.11±1.30	2.48±1.80	0.63±0.22

表 4 荷叶 8 种成分含量相关性结果
Table 4 Correlation results of 8 kinds of components in lotus leaf

	儿茶素	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	金丝桃苷	异槲皮苷	2-羟基-1-甲氧基阿朴啡	N-去甲基荷叶碱	荷叶碱	莲碱	综合评分
儿茶素	1.000								
槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	-0.026	1.000							
金丝桃苷	0.409	-0.868**	1.000						
异槲皮苷	0.260	0.805**	-0.574**	1.000					
2-羟基-1-甲氧基阿朴啡	0.413	-0.793**	0.975**	-0.498	1.000				
N-去甲基荷叶碱	0.524	-0.780**	0.918**	-0.567	0.887**	1.000			
荷叶碱	0.424	-0.848**	0.986**	-0.602**	0.976**	0.935*	1.000		
莲碱	-0.001	0.478	-0.392	0.027	-0.339	-0.126	-0.265	1.000	
综合评分	0.782**	-0.468	0.800**	-0.246	0.820**	0.841**	0.889**	0.059	1.000

注: *为相关性在 0.05 级别(双尾), 相关性显著; **为相关性在 0.01 级别(双尾), 相关性极显著。

表 5 自由基清除率与荷叶成分含量相关性结果
Table 5 Correlation between the clearance rate of lotus leaf and the content of various components

	儿茶素	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	金丝桃苷	异槲皮苷	2-羟基-1-甲氧基阿朴啡	N-去甲基荷叶碱	荷叶碱	莲碱
清除率/%	0.511*	-0.244	0.644**	-0.244	0.556*	0.539*	0.600*	-0.670

注: *为相关性在 0.05 级别(双尾), 相关性显著; **为相关性在 0.01 级别(双尾), 相关性极显著。

结果显示荷叶抗氧化活性与金丝桃苷含量呈极显著正相关($P<0.01$), 与荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、N-去甲基荷叶碱、儿茶素的含量呈现显著正相关性($P<0.05$)。提示金丝桃苷、荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、N-去甲基荷叶碱和儿茶素可作为荷叶抗氧化活性效应评价的标志成分。

2.2.2 脂肪酶抑制活性与荷叶成分含量相关性分析
精密吸取不同来源荷叶样品的供试品溶液, 分别稀释为 5 mg/mL 的样品溶液。按 1.3.3 项下方法进行测定。测得荷叶 S1~S10 的脂肪酶抑制率分别为 57.1%、46.1%、46.7%、53.1%、40.7%、56.3%、51.2%、51.4%、42%、50.1%。采用软件 SPSS 22.0 对 10 批荷叶样品中 8 种成分含量和脂肪酶抑制率进行相关性分析, 结果见表 6。

表 6 脂肪酶抑制率与荷叶各成分含量相关性结果
Table 6 Correlation between lipase inhibition rates and the contents of various components in lotus leaf

	儿茶素	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	金丝桃苷	异槲皮苷	2-羟基-1-甲氧基阿朴啡	N-去甲基荷叶碱	荷叶碱	莲碱
抑制率/%	0.481*	-0.638*	0.813**	-0.317	0.787**	0.828**	0.777*	-0.375

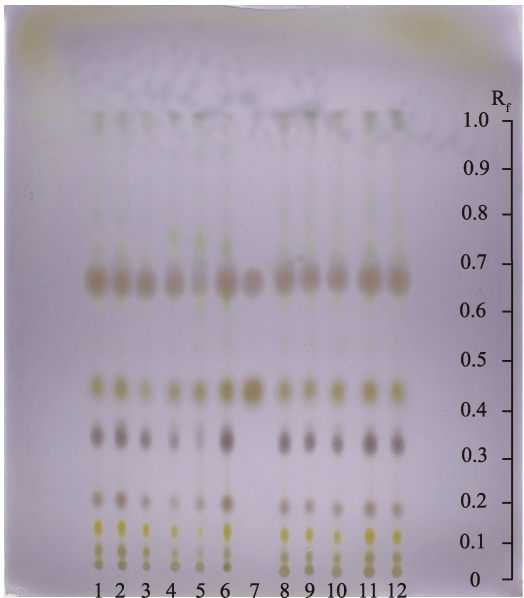
注: *为相关性在 0.05 级别(双尾), 相关性显著; **为相关性在 0.01 级别(双尾), 相关性极显著。

结果表明, 脂肪酶抑制率与 N-去甲基荷叶碱、金丝桃苷、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡呈现极显著正相关($P<0.01$), 与荷叶碱、儿茶素呈现显著正相关($P<0.05$)。提示 N-去甲基荷叶碱、金丝桃苷、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡和荷叶碱可作为荷叶抑制脂肪酶活性效应评价的标志成分。

2.3 TLC 鉴别及聚类分析

2.3.1 TLC 鉴别

取 1.2.1 项下方法制备的样品溶液、各对照品储备溶液和混合对照品溶液, 分别按照 1.3.4 项下方法操作。结果见图 2。



注: 1~5: S1、S4、S6、S8、S7; 6: S11; 7: 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、荷叶碱; 8~12: S5、S9、S10、S3、S2。

图 2 10 批荷叶药材薄层色谱

Fig.2 Thin layer chromatography of 10 batches of lotus leaf medicine

由图 2 可以看出, 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、荷叶碱可在 $R_f 0.42$ 和 $R_f 0.65$ 处出现深黄色斑点, 其余对照品在本条件下未检出。10 批荷叶样品和对照药材在相应位置处呈现出相同颜色的斑点, 对照药材 S11 与 S1、S4、S6 有明显斑点, 而其余样品斑点颜色较浅。提示荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡 2 个特征成分可作为不同来源荷叶样品的特征鉴别成分。

2.3.2 薄层色谱自动识别分析

采用按键精灵以及 YAHOO pmqs 软件对薄层色谱图进行自动取色分析, 按取色斑点位置及展开高度进行划分取色区域, 取色软件进行颜色识别、数据输出, 设置自动重复选点、取色、复制颜色代码的操作脚本, 对拍照图片进行自动取色, 计算每个像素点的总色值。所有斑点的颜色信息汇总后, 以 10 批荷叶药材薄层颜色数据信息为原始数据。采用软件 SPSS 22.0 对不同荷叶样品数据进行聚类分析见图 3、4。

由图 3 可知, 结果可知, S1、S4、S6 样品与对照药材 S11 聚为一类, 其余样品聚为一类。其中, S1、S4、S6 可见样品质量较好, S7、S8 样品质量与对照药材相差较大, 质量一般。聚类结果与薄层板颜色斑点信息基本一致。

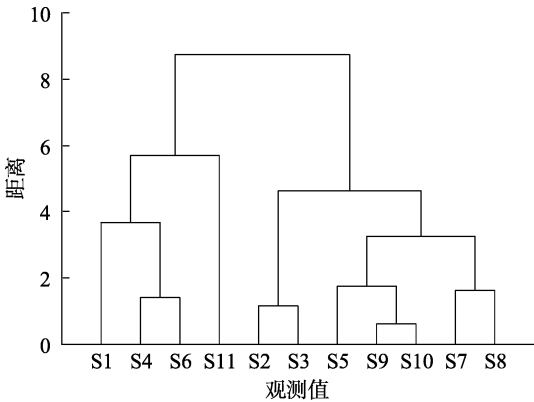


图 3 荷叶样品聚类分析图

Fig.3 Cluster analysis diagram of lotus leaf samples

由图 4 可知, 采用相同聚类分析条件分析荷叶样品薄层取样点, 共分为 2 大类, 其中荷叶碱为一类斑点代表, 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡为另一类斑点代表, 提示二者可作为荷叶样品质量分类评价的 2 个特征指标性成分。

3 结论与讨论

本研究以核壳色谱填料为固定相, 优化梯度洗脱的方式, 建立了同时测定荷叶中的 8 种活性成分的 HPLC 分析方法, 方法先进、准确, 成功实现荷叶生物碱和黄酮两类活性成分的同时测定。在测定条件考察过程中, 通过对测定波长 270、290、360 nm 的考察, 根据色谱峰信息和强度情况选择 270 nm 为测定波长。

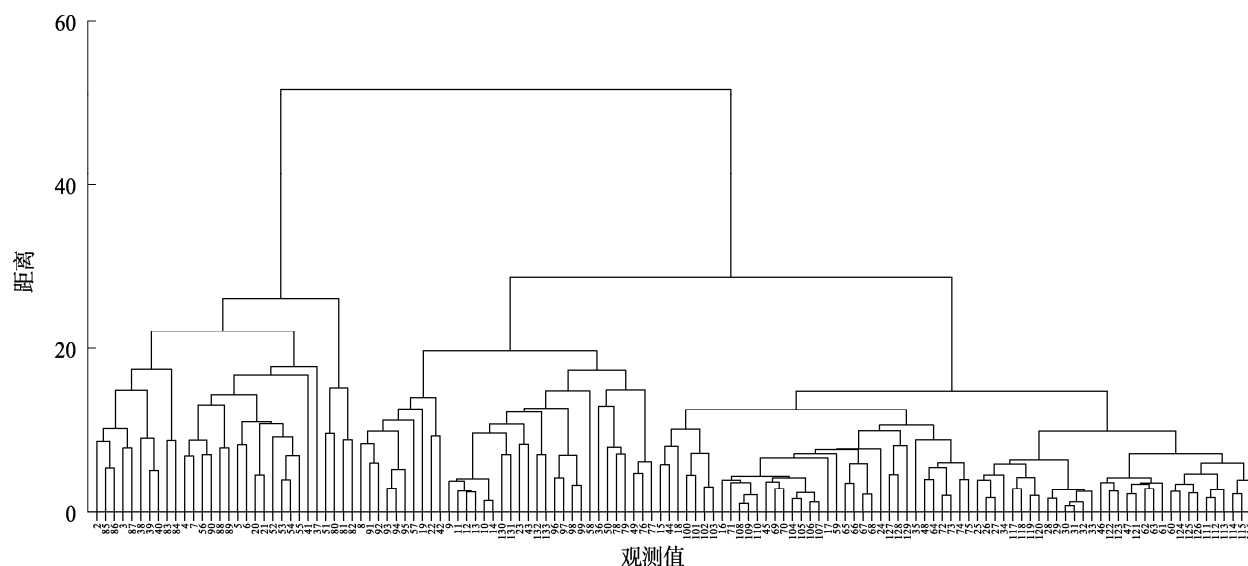


图 4 薄层斑点聚类分析图

Fig.4 Thin layer spot cluster analysis diagram

含量测定结果提示,在测定荷叶成分时应注意原料的质量情况。不同荷叶样品中 8 种成分含量差异较大,黄酮类成分槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷含量最高,为 (9.93 ± 3.06) mg/g、异槲皮苷、金丝桃苷次之;生物碱类成分以荷叶碱含量最高,为 (2.48 ± 1.80) mg/g、N-去甲基荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡次之。这可能与荷叶产地来源和采收时期有关^[29-30]。

本研究发现,荷叶碱、N-去甲基荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、金丝桃苷、儿茶素与 8 种成分总量的综合评分呈现显著正相关。金丝桃苷、荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、N-去甲基荷叶碱、儿茶素的含量与抗氧化活性呈现正相关。N-去甲基荷叶碱、金丝桃苷、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、荷叶碱、儿茶素与脂肪酶抑制率呈现正相关。综合化学质量分析评价和生物活性效应评价两方面结果,建议选择荷叶碱、N-去甲基荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡和金丝桃苷 4 种成分作为荷叶样品的含量测定评价指标。

薄层色谱鉴别考察结果提示,荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡可作为荷叶样品鉴别分类评价的 2 个特征指标性成分。2-羟基-1-甲氧基阿朴啡含量与 N-去甲基荷叶碱、金丝桃苷^[31-32]含量存在极显著相关性($P < 0.01$)。荷叶碱与金丝桃苷含量存在极显著相关性($P < 0.01$),与 N-去甲基荷叶碱含量存在显著相关性($P < 0.05$)。确定荷叶质量评价指标成分即要综合分析各个成分对荷叶质量、功效的评价意义,又要考虑标准适用性。考虑标准适用性,则可考虑在中国药典(2020 年版)荷叶碱为含量测定指标的基础上,增加 2-羟基-1-甲氧基阿朴啡作为荷叶样品的鉴别特征成分,完善荷叶质量评价方法。

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, 2020.

National Pharmacopoeia Commission, Chinese Pharmacopoeia, first volume [M]. Beijing: China Medical and Technology Press, 2020.

- [2] QIU MA, XIAO FA, WANG TA, *et al.* Protective effect of Hedansanqi Tiaozhi Tang against non-alcoholic fatty liver disease *in vitro* and *in vivo* through activating Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 67: 153140.
- [3] YE LH, HE XX, KONG LT, *et al.* Identification and characterization of potent CYP2D6 inhibitors in lotus leaves [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(1): 190-196.
- [4] 刘佳, 朱建广, 孔令弢, 等. 荷叶水提取物的急性毒性及辅助降血脂功效研究[J]. *现代食品*, 2021, (9): 85-90.
LIU J, ZHU JG, KONG LG, *et al.* Study on acute toxicity and auxiliary hypolipidemic activity of lotus leaf aqueous extract [J]. *Mod Food*, 2021, (9): 85-90.
- [5] GRIENKE U, MAIR CE, SAXENA P, *et al.* Human ether-à-go-go related gene (herg) channel blocking aporphine alkaloids from lotus leaves and their quantitative analysis in dietary weight loss supplements [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(23): 5634-5639.
- [6] 陶悦. 肠球菌发酵荷叶上清对 3T3-L1 前脂肪细胞及肥胖大鼠的降脂作用机制探究[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
TAO Y. Exploring lipid-lowering mechanism on 3T3-L1 cells and obese rats via supernatant of *Enterococcus* fermented lotus leaf [D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.
- [7] 程婷婷, 原新博, 惠小涵, 等. 荷叶生物碱成分及其调脂机制研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1998-2003.
CHENG TT, YUAN XB, HUI XH, *et al.* Research progress on chemical constituents and lipid-lowering mechanism of alkaloids in *Nelumbinis folium* [J]. *Chin Herbal Drugs*, 2019, 50(8): 1998-2003.
- [8] CHEN HW, YANG MY, HUNG TW, *et al.* *Nelumbo nucifera* leaves extract attenuate the pathological progression of diabetic nephropathy in high-fat diet-fed and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(3): 736-748.
- [9] 蒋锡兰, 王伦, 李甫, 等. 荷叶的抗氧化活性成分[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(1): 89-94.

- JIANG XL, WANG L, LI F, *et al.* Antioxidant components of lotus leaf [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, 23(1): 89–94.
- [10] AFAF N, ABDEL R. Alleviative effects of dietary Indian lotus leaves on heavy metals-induced hepato-renal toxicity, oxidative stress, and histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)—science direct [J]. *Aquacult (Amsterd, Netherl)*, 2019, 509: 198–208.
- [11] ZHU Y, HU P, YAO J, *et al.* Optimal dietary alcoholic extract of lotus leaf improved growth performance and health status of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 93: 1–7.
- [12] YTA B, LLA B, MZAB C. Screening of bioactivity-oriented extraction approach and quality control standards of lotus leaf extracts with dual functions [J]. *J Food Biol*, 2021, 44: 101462.
- [13] 王智能, 王允, 吴光旭, 等. 体外模拟胃肠消化对不同热处理荷叶中酚类物质释放量及抗氧化活性的影响[J]. *核农学报*, 2019, 33(10): 1975–1982.
- WANG ZN, WANG Y, WU GX, *et al.* Phenolic substances in lotus leaves of different heat treatments were simulated by gastrointestinal digestion in vitro effect of release amount and antioxidant activity [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2019, 33(10): 1975–1982.
- [14] 蒋如剑. 仿生微纳结构表面设计制备及抗菌性能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- JIANG RJ. Design, fabrication and antibacterial property of bionic micro/nano-structured surfaces [D]. Changchun: Jilin University, 2021.
- [15] CHO WK, YANG HJ, MA JY. Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaf water extracts suppress influenza a viral infection via inhibition of neuraminidase and hemagglutinin [J]. *J Fun Foods*, 2022, 91: 105019.
- [16] 潘利君, 陈晖, 江闻, 等. 荷叶提取物抑制微生物的研究进展及其应用[J]. *中药材*, 2017, 40(10): 4.
- PAN LJ, CHEN H, JIANG W, *et al.* Research progress and application of lotus leaf extract inhibiting microorganisms [J]. *J Chin Med Mater*, 2017, 40(10): 4.
- [17] 王学圆, 代云桃, 靳如娜, 等. 荷叶标准汤剂质量评价方法的建立[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(6): 1363–1367.
- WANG XY, DAI YT, JIN RN, *et al.* Quality evaluation methods for standard decoction of nelumbinis folium [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(6): 1363–1367.
- [18] 李慧芬, 张学兰, 崔伟亮, 等. HPLC 同时测定不同产地荷叶饮片 4 种黄酮成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(2): 55–58.
- LI HF, ZHANG XL, CUI WL, *et al.* Simultaneous determination of four flavonoids in nelumbinis folium from different origins by hplc experimental [J]. *China J Exp Tradit Med Formul*, 2014, 20(2): 55–58.
- [19] DO T, NGUYEN TD, TRAN H, *et al.* Analysis of alkaloids in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves by non-aqueous capillary electrophoresis using ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1302: 174–180.
- [20] GAO H, ZHANG L, ZHU A, *et al.* Metabolic profiling of nuciferine in vivo and in vitro [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(48): 14135–14147.
- [21] CHEN YH, CHEN QW, WANG XZ, *et al.* Hemostatic action of lotus leaf charcoal is probably due to transformation of flavonol aglycons from flavonol glycosides in traditional Chinese medicine—Science Direct [J]. *J Ethnopharm*, 2020, 249: 112364.
- [22] 梁佳文, 刘艾洁, 马冰馨, 等. 高效液相色谱法同时测定荷叶中 6 种黄酮类成分[J]. *植物科学学报*, 2015, 33(6): 861–866.
- LIANG JW, LIU AJ, MA BX, *et al.* Simultaneous determination of six flavonoid compounds in lotus leaves by high performance liquid chromatography [J]. *Plant Sci J*, 2015, 33(6): 861–866.
- [23] 李美娣, 陈素珍, 武力, 等. 中兽药口服液中荷叶薄层色谱鉴别方法研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2019, 38(6): 38–40.
- LI MT, CHEN SZ, WU L, *et al.* Thin layer chromatography identification method of nelumbinis folium in traditional Chinese medicine oral liquid [J]. *J Tradit Chin Veter Med*, 2019, 38(6): 38–40.
- [24] 黄媛, 高广慧. 荷叶提取物的质量标准研究[J]. *山东化工*, 2016, 45(9): 66–69.
- HUANG Y, GAO GH. Study on quality standard for lotus leaf extract [J]. *Shandong Chem Ind*, 2016, 45(9): 66–69.
- [25] 杜淑琴. 烹饪中抗氧化营养素与人体健康[J]. *食品安全导刊*, 2021, (23): 112–113, 115.
- DU SQ. Antioxidant nutrients in cooking and human health [J]. *China Food Safe Magaz*, 2021, (23): 112–113, 115.
- [26] 张静. 黑果枸杞花色苷对胰脂肪酶活性及高脂诱导肥胖小鼠的影响[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2020.
- ZHANG J. Effects of anthocyanins of *Lycium ruthenicum* on pancreatic lipase activity and obesity induced by high fat in mice [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2020.
- [27] AGA A, ZG A, IB B, *et al.* UHPLC-DPPH method reveals antioxidant tyramine and octopamine derivatives in *Celtis occidentalis* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 191: 113612.
- [28] 侯成波. 荷叶脂肪酶抑制及肠吸收评价研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- HOU CB. Study on lipase inhibition and intestinal absorption of lotus leaf [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016.
- [29] 何晓曦, 孔令提, 张泽生, 等. 不同产地和不同采收期荷叶中生物碱的含量变化[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(5): 652–655, 661.
- HE XX, KONG LT, ZHANG ZS, *et al.* Changes of alkaloid content in lotus leaves from different producing areas and harvesting periods [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2013, 25(5): 652–655, 661.
- [30] 黄旭东, 晁鲁平, 项庆琰, 等. 不同产地荷叶功能性成分的评价[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(12): 153–158.
- HUANG XD, CHAO LP, XIANG QY, *et al.* Evaluation of functional components of Lotus Leaves from different regions [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(12): 153–158.
- [31] LI M, CHEN X, DENG J, *et al.* Effect of thermal processing on free and bound phenolic compounds and antioxidant activities of hawthorn [J]. *Food Chem*, 2020, 332(1): 127429.
- [32] NOVAES P, TORRES PB, CORNU TA, *et al.* Comparing antioxidant activities of flavonols from *Annona coriacea* by four approaches [J]. *South Afr J Botany*, 2019, 123: 253–258.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



田盛, 硕士研究生, 主要研究方向为中药分析及质量研究。
E-mail: ts0805_email@163.com



王海波, 博士, 教授, 主要研究方向为中药药效物质分析与质量评价研究。
E-mail: whb_email@126.com