

HPLC 测定不同采收期畚药搯公扭根中鞣质类成分含量

毛菊华¹, 王伟影¹, 范蕾¹, 余华丽¹, 李水福¹, 程科军^{2*} (1.丽水市食品药品与质量技术检验检测院, 浙江 丽水 323000; 2.丽水市农业科学研究院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 采用 HPLC 测定不同月份畚药搯公扭根中鞣质类成分没食子酸和鞣花酸含量, 确定其最佳采收期。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 263 nm。结果 不同月份搯公扭根药材中没食子酸含量的差异相对较小, 鞣花酸含量的差异较大, 但两者在 11 月—1 月期间的含量均较高。结论 搯公扭根以鞣质类成分没食子酸和鞣花酸含量为指标, 11 月—1 月为最佳采收期。

关键词: 搯公扭根; 畚药; 鞣质; 没食子酸; 鞣花酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)03-0393-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.019

Determination of Tannin in Traditional SHE Medicine Rubi Radix et Rhizoma at Different Harvest Time by HPLC

MAO Juhua¹, WANG Weiying¹, FAN Lei¹, YU Huali¹, LI Shuifu¹, CHENG Kejun^{2*} (1.Lishui Institute for Food and Drug & Quality and Technology Control, Lishui 323000, China; 2.Lishui Institute of Agricultural Sciences, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for determination of tannin-gallic acid and ellagic acid in traditional SHE medicine Rubi Radix et Rhizoma, and to confirm its best harvest time. **METHODS** The HPLC was applied with the chromatographic condition as follows: the chromatographic column was Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with column temperature of 30 ℃; the mobile phase was a mixed liquid with methanol-0.1% H₃PO₄ solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; and the detection wavelength was 263 nm. **RESULTS** There was no significant difference of the content of gallic acid between different months, while the content of ellagic acid was significantly different, and both content was the highest in November to January. **CONCLUSION** It is suggested that the best harvest time of Rubi Radix et Rhizoma of tannin (gallic acid and ellagic acid) is in November to January.

KEY WORDS: Rubi Radix et Rhizoma; traditional SHE medicine; tannin; gallic acid; ellagic acid; HPLC

畚药搯公扭根为蔷薇科悬钩子属植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥根及根茎^[1], 与中药覆盆子(未成熟果实)同源不同药用部位, 主要分布于浙江、江苏、安徽、江西和福建等华东地区, 多生长于低海拔至中海拔的林缘、山坡、灌丛、路边和沟边等土壤较湿润地段。《高等植物学》记载其有“活血化瘀”的功用, 樊天福经临床实践认为其味甘、酸、涩, 性平, 无毒, 入肺、脾、肾经, 可清热解毒(抗炎杀菌)、平调阴阳, 通利大小便而不伤正等^[2]。畚医认为其可祛风止痛、明目退翳、和胃止呕, 主要用于结核性瘰管, 结核病所致的脊柱压迫症等^[1,3], 为常见畚药。参考覆盆子相关研究^[4-5]及前期化学成分研究, 发现该药材中主要含有鞣质类及三萜类物质, 其中鞣质类又

以没食子酸和鞣花酸的含量相对较高, 现代药理研究表明, 该 2 种成分具有多种药理活性^[6-7], 且与搯公扭根的性能功效相对应。本实验拟建立 HPLC 对搯公扭根中的没食子酸和鞣花酸进行含量测定, 并对其动态累积情况进行分析研究, 以确定其最佳采收期, 为该畚药材的资源开发以及质量评价和控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); G4212B 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); XS105DU 电子天平(瑞士梅特勒公司); HH-6 型水浴锅(上海梅香仪器公司)。

甲醇、磷酸和二甲基亚砩均为色谱纯; 水为超纯水; 其他均为分析纯; 鞣花酸对照品(成都普

基金项目: 丽水市科技计划项目(20140212037, 2014JYZB04); 浙江省食品药品监督管理与产业发展研究会项目(ZYH2015009)

作者简介: 毛菊华, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0578)2183956
士, 副研究员 Tel: (0578)2028385 E-mail: chengkejun@gmail.com

E-mail: maomaotou198712@163.com *通信作者: 程科军, 男, 博

菲德生物技术有限公司, 批号: 130922, 含量 $\geq 99\%$); 没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110831-201204, 含量: 89.9%)。搁公扭根药材均采于丽水市松阳县境内, 经丽水市检验检测院李水福主任中药师鉴定为蔷薇科植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的根及根茎, 凭证标本均存放于检测院中药标本室内, 具体见表 1。

表 1 搁公扭根药材一览

Tab. 1 Source of Rubi Radix et Rhizoma

NO.	月份	水分	NO.	月份	水分
GGNG-1	1 月	5.6%	GGNG-7	7 月	8.5%
GGNG-2	2 月	6.8%	GGNG-8	8 月	9.1%
GGNG-3	3 月	9.5%	GGNG-9	9 月	7.8%
GGNG-4	4 月	7.9%	GGNG-10	10 月	7.9%
GGNG-5	5 月	9.1%	GGNG-11	11 月	12.8%
GGNG-6	6 月	9.4%	GGNG-12	12 月	10.8%

注: 水分采用烘干法在 105 °C 测得。

Note: The water content was determined by drying in an oven at 105 °C.

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~10 min, 5% A; 10~12 min, 5%→40% A; 12~30 min, 40%→60% A; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 263 nm; 进样量: 5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、鞣花酸对照品适量, 各置于 25 mL 量瓶中, 分别加甲醇、二甲基亚砜制成每 1 mL 含没食子酸 483.2 μg、鞣花酸 821.7 μg 的溶液, 作为储备液。精密吸取 2 种储备液适量置同一 20 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 分别含没食子酸 145.0 μg、鞣花酸 328.7 μg 的混合溶液, 作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取搁公扭根药材粉末(过三号筛)0.3 g, 精密称定, 加入含 10% HCl 的 50%乙醇 25 mL, 加热回流提取 2.5 h, 取出放至冷却, 以含 10% HCl 的 50%乙醇补足减失的重量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

2.3 系统适用性试验

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液、“2.2.2”项下溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 1。在该色谱条件下, 没食子酸和鞣花酸与其他成分均可达到基线分离, 分离度

均>1.5, 分离效果较好, 理论板数均>8 000。

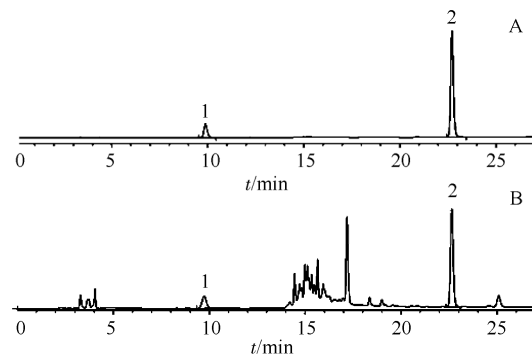


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-没食子酸; 2-鞣花酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-sample; 1-gallic acid; 2-ellagic acid.

2.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归, 得到没食子酸回归方程为 $Y=13.955\ 9X+373.224\ 0$, $r^2=0.999\ 9$, 线性范围: 14.5~145.0 μg·mL⁻¹; 鞣花酸回归方程为 $Y=35.591\ 3X+2\ 753.650\ 0$, $r^2=0.999\ 9$, 线性范围: 32.87~328.70 μg·mL⁻¹。

2.5 仪器精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 计算没食子酸峰面积的 RSD 为 0.35%, 鞣花酸峰面积的 RSD 为 0.21%, 结果显示仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批搁公扭根药材(编号: GGNG-1)粉末 0.3 g, 平行取样 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件测定, 按干燥品计算供试品中没食子酸和鞣花酸的含量分别为 0.17%, 1.12%, RSD 分别为 1.21%, 0.86%, 结果表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取“2.6”项下同一供试品溶液, 分别在 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 进样, 计算没食子酸峰面积的 RSD 为 1.02%, 鞣花酸峰面积的 RSD 为 0.94%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的搁公扭根药材粉末(编号: GGNG-1)6 份, 各 0.15 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入没食子酸对照品溶液(483.2 μg·mL⁻¹)0.5 mL、鞣花酸对照品溶液

(821.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)2 mL, 按“2.2.2”项下方法制备回收率试液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 测定没食子酸和鞣花酸的含量, 计算回收率, 结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of recovery test($n=6$)

被测成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/%	平均回收 率/%	RSD/%
没食子酸	0.239 4	0.241 6	0.474 4	97.28	98.89	1.39
	0.238 3	0.241 6	0.480 3	100.17		
	0.240 9	0.241 6	0.478 2	98.21		
	0.239 2	0.241 6	0.481 2	100.16		
	0.238 6	0.241 6	0.474 2	97.52		
	0.237 7	0.241 6	0.479 3	100.02		
鞣花酸	1.623 0	1.643 4	3.261 2	99.69	99.56	1.53
	1.615 6	1.643 4	3.269 2	100.62		
	1.633 6	1.643 4	3.290 2	100.81		
	1.621 9	1.643 4	3.279 8	100.88		
	1.617 7	1.643 4	3.228 9	98.04		
	1.611 3	1.643 4	3.211 2	97.35		

2.9 样品含量测定结果

取不同月份的搁公扭根样品 0.3 g, 各 3 份, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 按干燥品计算含量, 结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab. 3 Results of sample determination($n=3$)

编号	没食子酸/%	鞣花酸/%	总和/%
GGNG-1	0.17	1.12	1.29
GGNG-2	0.18	0.21	0.39
GGNG-3	0.20	0.03	0.23
GGNG-4	0.11	0.15	0.26
GGNG-5	0.10	0.06	0.16
GGNG-6	0.22	0.20	0.42
GGNG-7	0.08	0.25	0.33
GGNG-8	0.15	0.16	0.31
GGNG-9	0.06	0.40	0.46
GGNG-10	0.08	0.04	0.12
GGNG-11	0.20	1.46	1.66
GGNG-12	0.18	1.42	1.60
RSD/%	38.0	117.7	93.9

3 讨论

3.1 提取方法考察

在采用加热回流提取法^[8-9]的基础上, 考察了以水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇等为溶剂的10%HCl 溶液对搁公扭根中没食子酸和鞣花酸的提取效果, 结果以含 10%HCl 的 50%乙醇提取最完全; 考察了加热回流 1, 2, 3, 4 h, 结果显示鞣花酸和没食子酸分别在 2 h 和 3 h 时含量达到最大值, 综合考虑, 实验选取 2.5 h 为提取时间。

3.2 结果与分析

由表3可见, 于松阳县境内同一地点 12 个月

内采集的搁公扭根药材中, 没食子酸含量的波动相对较小, 尤其是 11 月—3 月期间, 含量均在 0.17%~0.20%; 相比之下, 鞣花酸含量的波动较大, 在 11 月—1 月期间的含量较其他月份高很多。鉴于搁公扭根为根及根茎类药材, 其成分的累积多与地上部分的生长发育有关, 11 月以后华东覆盆子的地上部分基本枯萎, 成分向根部转移, 故含量较高, 与根及根茎类药材一般宜在秋冬季地上部分将枯萎时或春初发芽前采收相对应。综上所述, 拟定 11 月—1 月为搁公扭根的最佳采收期。

2005 年版和 2015 年版《浙江省中药炮制规范》^[10-11]

均以畜药名搁公扭根收载此品种, 具体检验项目仅有性状和显微鉴别, 该药作为常用畜药, 建立更为完善的质量标准是极其必要的。本实验首次建立 HPLC 测定其主要鞣质类成分没食子酸和鞣花酸的含量并确定了最佳采收期, 为其下一步质量标准的制定提供了参考。

REFERENCES

- [1] 雷后兴, 李水福. 中国畜族医药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 307-308.
- [2] 樊天福. 覆盆子根治疗急性肾炎 45 例[J]. 江西中医药, 1999, 30(5): 58.
- [3] ZHU M X, YAN L H, WU T, et al. Research status on characteristic medicine varieties of She nationality collected by Zhejiang provincial standard [J]. China Pharm(中国药业), 2013, 22(9): 4-6.
- [4] XIE Y H, ZHOU L J, LUO J L, et al. Isolation and structure identification of chemical constituents from *Rubus chingii* Hu [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2013, 24(4): 786-787.
- [5] HE J M, SUN N, WU W D. Determination of ellagic acid, flavonoids and goshonoside-F5 in Rubi Fructus by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(24): 4351-4356.
- [6] GAO Y, MA H, WANG S W, et al. Research progress of pharmacological action and pharmacokinetics of gallic acid [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2014, 29(4): 435-438.
- [7] GUO Z J, TAN L, XU Y, et al. Distribution of ellagic acids in plantae and their bioactivities [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2010, 22(3): 519-524, 540.
- [8] LIU M, YU L, LI S F, et al. Determination of gallic acid and quercetin in different parts and period of traditional She Medicine-Melastoma dodecandrum [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(11): 1351-1355.
- [9] JIN X, WANG F, YAO L, et al. Determination of gallic acid and ellagic acid in *Geranium carolinianum* L. by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(7): 1172-1176.
- [10] 浙江省中药炮制规范 2005 年版[S]. 2006: 625.
- [11] 浙江省中药炮制规范 2015 年版[S]. 2016: 94.

收稿日期: 2016-08-24

(本文责编: 李艳芳)