

生长年限、采收期及施肥对唐古特大黄中儿茶素含量的影响

沈娜^{1,2}, 崔玉磊^{1,2}, 周华坤¹, 徐文华^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省寒区恢复生态学重点实验室, 藏药研究重点实验室, 西宁 810001; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

[摘要] 目的:比较青海省东部农业区不同生长年限、采收期及施肥对唐古特大黄 *Rheum tanguticum* 药材中儿茶素含量的影响,确定这一区域采收唐古特大黄的最佳时间和施肥量。方法:设置5月,7月,10月3个采收期采收施加肥料(磷肥、钾肥)的二、三、四年生栽培唐古特大黄,样品的甲醇提取液高效液相色谱法(HPLC)分析采用 Platisil SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);柱温 25 ℃;以乙腈-0.1% 甲酸为流动相进行梯度洗脱;进样量 15 μL,流速 0.8 mL·min⁻¹;检测波长 224 nm。结果:儿茶素在进样量 0.424 ~ 10.60 μg 时线性关系良好,相关系数为 0.999 9。随生长年限的增加,儿茶素含量随之增加;同一年限不同采收期儿茶素平均含量 5 月份最高,7 月份次之,10 月份最低;施肥能够增加唐古特大黄中儿茶素的含量。结论:以儿茶素含量为采收指标时,宜采收三年生或四年生唐古特大黄,最佳采收期为 5 月,宜施加磷肥 P₂O₅ 45 kg·ha⁻¹。三、四年生唐古特大黄 5 月份,7 月份儿茶素平均含量均 > 20 mg·g⁻¹。建议唐古特大黄中儿茶素质量分数不少于 20% 定为完善唐古特大黄药材质量控制的实验依据。

[关键词] 唐古特大黄; 儿茶素; 含量; 高效液相色谱法; 生长年限; 采收期; 施肥

[中图分类号] R284.1;R282.2;R22;R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0038-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180829

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1515.001.html>

[网络出版时间] 2018-01-24 17:05

Contents of Catechin in Radix and Rhizoma of *Rheum tanguticum* at Different Growing Stages and Harvesting Stages and with Different Fertilizer Doses

SHEN Na^{1,2}, CUI Yu-lei^{1,2}, ZHOU Hua-kun¹, XU Wen-hua^{1*}

(1. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Key Laboratory of Restoration Ecology in Cold Area of Qinghai Province, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xi'ning 810001, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the content of catechin in radix and rhizoma of *Rheum tanguticum* at different growing stages and harvesting stages and with different fertilizer doses in Donggou Village, Huzu County, Qinghai province, in order to determine the best harvesting stage and fertilizer dose. **Method:** Three harvesting stages were designed in May, July and October every year, and two-year-old, three-year-old and four-year-old *R. tanguticum* radix and rhizoma were fertilized with phosphorus (superphosphate) and potassium (potassium sulfate) fertilizers. The methanol extracts were analyzed through HPLC. Platisil SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted and eluted with acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase in a gradient mode. The column

[收稿日期] 20171101(004)

[基金项目] 国家星火计划项目(2015GA870007);青海省应用基础研究项目(2017-ZJ-749);青海省创新平台建设专项(2017-ZJ-Y20);青海省自然科学基金面上项目(2016-ZJ-910)

[第一作者] 沈娜,在读硕士,从事天然药物化学研究, E-mail:shenna62@163.com

[通信作者] *徐文华,硕士,副研究员,从事特色药用植物资源栽培与化学成分分析研究工作, E-mail:whxu@nwipb.cas.cn

temperature was 25 °C, the injection volume was 15 μL, the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹; the wavelength was 224 nm. **Result:** The linear ranges of catechin was 0.424-10.60 μg ($r = 0.9999$), the content of catechin gradually increased with the rise of growing years; the average content of catechin came to the maximum in May, which was followed by July, and the least content was observed in October; the content of catechin in fertilizer group was higher than that of the control group. **Conclusion:** With the catechin content as the harvesting indicator, three or four-year-old *R. tanguticum* radix and rhizoma is suitable for harvesting, the optimal harvesting stages are May, and P₂O₅ 45 kg·ha⁻¹ was the most appropriate. Catechin content of three or four-year-old *R. tanguticum* radix and rhizoma exceeded 20 mg·g⁻¹. Therefore, catechin content is suggested to be no less than 20%, which provides a basis for the quality control of *R. tanguticum* radix and rhizoma.

[Key words] radix and rhizoma of *Rheum tanguticum*; catechin; content; HPLC; growing years; harvesting stage; fertilization

唐古特大黄为蓼科植物,具有泻下,抗菌、抗病毒、抗炎,抗肿瘤、抗突变,保肝利胆以及保护心血管等作用^[1]。已从唐古特大黄中分离得到蒽醌类衍生物、蒽酮类衍生物、鞣质类、酰基糖苷类、色酮类、苯丁酮苷类等各类型化合物 200 多个^[2]。近年来,对唐古特大黄中鞣质类化合物研究相对较多、较为深入。鞣质类化合物作为大黄的一类药效成分,含量较高,一般可达到 10%~30%。大黄中提取的儿茶素,可加快血小板黏附和聚集,降低纤溶活性,保护组织损伤,消炎利胆抑制血管紧张素转换酶、治疗精神病、消炎镇痛和抗病毒等作用^[3-4]。国内对唐古特大黄儿茶素的研究主要集中于炮制品的作用机制^[3-5],通过对不同产区唐古特大黄进行调查,野生资源破坏严重已经濒临枯竭。栽培大黄已经逐渐成为大黄药材的主要来源,为了更全面地保证药材的质量,本研究以儿茶素为指标性成分来评估栽培大黄的质量^[1,6]。随着研究的不断进行,儿茶素必将显示出更多医药用途。目前关于儿茶素含量测定的研究报道相对较少,因此本研究对栽培唐古特大黄的儿茶素进行深入探究。

2015 年版《中国药典》一部规定大黄中芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚的总量不得少于 1.5%^[7];《日本药局方》规定大黄番泻苷 A 和番泻苷 B 的总量不低于 0.25%^[8],但并无对儿茶素含量的规定。且不同的肥料梯度及采收期对药材含量有一定的影响^[9-12]。本文采用反相高效液相色谱二极管阵列检测器法(RP-HPLC-DAD)对二、三、四年生 3 个不同采收期及不同施肥梯度的唐古特大黄中儿茶素进行含量测定,该方法可为青海省唐古特大黄儿茶素的质量评价提供实验依据,也可为栽培唐古特大黄的施肥量提供一定的理论依据。

1 材料

1200 系列色谱仪(美国安捷伦科技公司);G1315DDAD 型检测器,Platisil SB-C₁₈ 色谱柱(迪马科技);KQ-500DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AL104 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);水为超纯水(美国 Bedford 公司);乙腈、甲酸为色谱纯(山东禹王制药有限公司);其他试剂均为分析纯。

儿茶素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110877-201604,纯度 ≥ 99.20%),唐古特大黄样品分别于 2014 年 10 月,2015 年 5 月,7 月,10 月和 2016 年 5 月,7 月,10 月采挖于青海省互助县东沟乡唐古特大黄药材种植试验示范基地,经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定均为唐古特大黄 *Rheum tanguticum* 的根和根茎,于 45 °C 烘箱烘干备用。唐古特大黄磷肥施用过磷酸钙(12.0% P₂O₅),钾肥施用硫酸钾(50.0% K₂O),梯度为 P₀, P₁, P₂, P₃ 分别施 0, 2.25, 4.5, 9.0 g·m⁻² P₂O₅; K₀, K₁, K₂, K₃ 分别施 3.75, 7.5, 11.25 g·m⁻² K₂O。

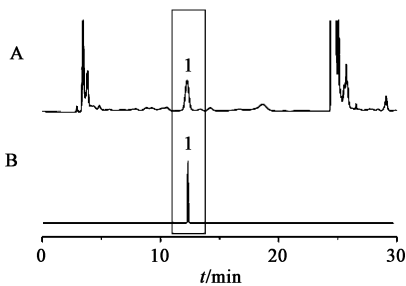
2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取儿茶素对照品 5.3 mg,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 212 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取干燥样品粉末(45 目) 0.5 g,置于 100 mL 量瓶中,加入 40% 甲醇 20 mL,30 °C 下超声(500 W, 40 kHz) 60 min,冷却至室温,甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤后用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 迪马科技 Platisil SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸(B),梯度洗脱(0~8 min, 8%~15% A; 8~17 min, 15%~17% A);流速 0.8 mL·min⁻¹;检测波

长 280 nm;柱温 25 °C;进样量 15 μL。该色谱条件下儿茶素与其他组分基线分离良好。对照品和样品的色谱图见图 1。



A. 供试品;B. 对照品;1. 儿茶素

图 1 唐古特大黄的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Rheum tanguticum* radix and rhizoma

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取 2.1 项下对照品溶液,依次进样 2,4,6,8,10,20,40,50 μL。按照 2.3 项下色谱条件测定峰面积。以儿茶素进样量 (X)对峰面积 (Y)进行回归,得儿茶素标准曲线 $Y = 731.6X - 519.5$ ($r = 0.9999$),在 0.424 ~ 10.60 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.1 项下的对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件连续重复进样 6 次,每次 10 μL,测定峰面积。结果儿茶素峰面积的 RSD 0.9%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取 2016 年 5 月份采收的互助县东沟乡唐古特大黄同一批药材粉末 6 份,每份 0.5 g,分别按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,按照 2.3 项下色谱条件进样 10 μL 测定含量。结果儿茶素的平均质量分数为 38.17 mg · g⁻¹,RSD 0.9%,表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一批次供试品(2016 年 5 月)溶液,按照 2.3 项下色谱条件分别于 1,2,4,8,10,12,24 h 测定,测得儿茶素峰面积 RSD 1.3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取同一批次供试品唐古特大黄粉末 6 份,每份约 0.50 g,分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中,并分别精密加入儿茶素(0.232 g · L⁻¹)对照品溶液 10 mL,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,进行测定,计算回收率,儿茶素的平均回收率为 105.12%,RSD 0.5%。见表 1。

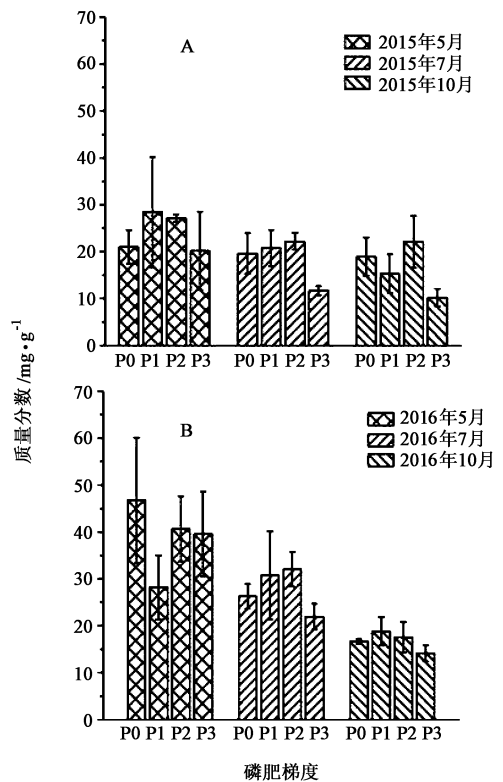
2.9 样品测定 取供试品溶液,按照 2.2 项下方法和 2.3 项下色谱条件对不同年份、不同采收期及不同肥料梯度的唐古特大黄药材含量进行测定,对数据使用 Origin 8.0 进行分析,结果分别见图 2 ~ 5。

表 1 儿茶素含量测定加样回收率试验

Table 1 Recovery tests of catechin

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.493 1	18.822	43.304	105.53		
0.500 0	19.085	43.561	105.50		
0.499 9	19.081	43.433	104.96	105.12	0.5
0.500 2	19.093	43.318	104.42		
0.500 0	19.085	43.359	104.63		
0.500 1	19.089	43.613	105.71		

注:加入量均为 23.2 mg。



A. 三年生;B. 四年生(图 3 同)

图 2 不同采收期、施加磷肥的三、四年生唐古特大黄儿茶素含量变化趋势($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Contents of catechin in three-, four-year-old *Rheum tanguticum* radix and rhizoma from different harvesting stages by applying phosphorus fertilizer ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 结论与讨论

3.1 不同提取方法和提取溶液的选择 为了全面提取唐古特大黄中的儿茶素的含量,使结果更有说服力,本实验考虑了不同的提取液(水,20%,40%,60%乙醇和甲醇)进行测试,发现水提法,儿茶素含量较低;不同体积分数的乙醇提取液所得含量差异并不明显,与甲醇提取液相比,40%甲醇中儿茶素含量较高,并且液相色谱图基线平稳、峰形良好且分离

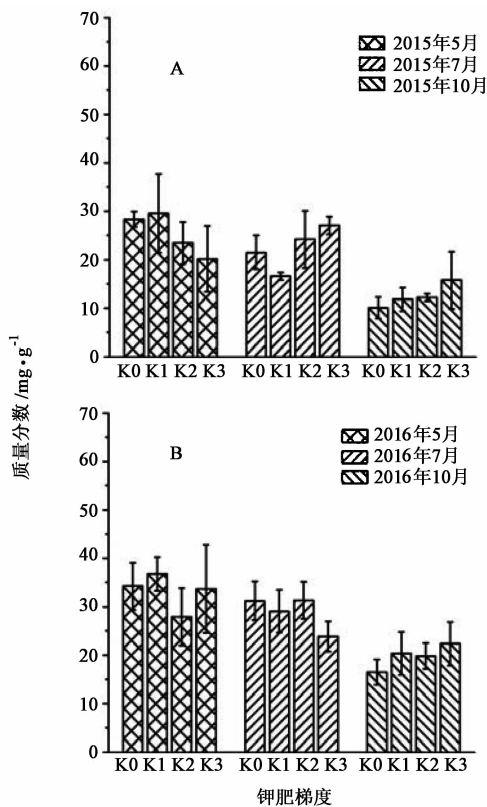


图3 不同采收期、施加钾肥的三、四年生唐古特大黄儿茶素含量变化趋势($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Contents of catechin in three-, four-year-old *Rheum tanguticum* radix and rhizoma from different harvesting stages by applying potassium fertilizer($\bar{x} \pm s, n=3$)

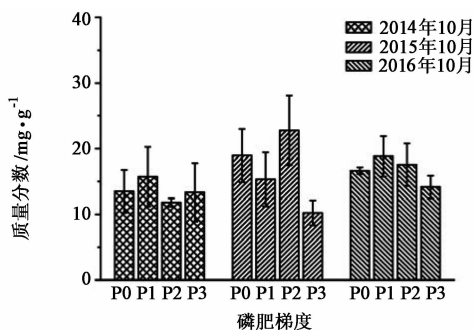


图4 施加磷肥唐古特大黄年际间儿茶素含量变化趋势($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Contents of catechin in *Rheum tanguticum* radix and rhizoma from different growing stages by applying phosphorus fertilizer($\bar{x} \pm s, n=3$)

度高,对超声提取时间(20,40,60,80 min)进行对比,发现超声60 min时,提取液中儿茶素含量居最高。因此,得到简便、快速且含量高的提取方法为40%的甲醇进行超声提取60 min。

3.2 不同采收期、不同肥料梯度的三、四年生唐古特大黄中儿茶素含量测定 12批采自东沟乡3个采收期,8个肥料梯度的供试品测定结果见图2,3。

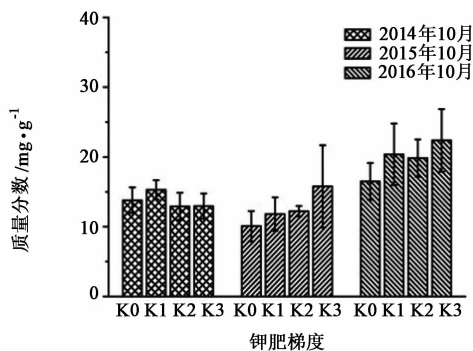


图5 施加钾肥唐古特大黄年际间儿茶素含量变化趋势($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Contents of catechin in *Rheum tanguticum* radix and rhizoma from different growing stages by applying potassium fertilizer($\bar{x} \pm s, n=3$)

由图2,3可知,同一年份5月,7月,10月3个不同采收期唐古特大黄儿茶素平均含量随采收期的增加呈现减少的趋势。施加磷肥唐古特大黄儿茶素含量的变化范围为10.22~46.71 mg·g⁻¹,同样的,施加钾肥的含量变化范围为10.07~36.77 mg·g⁻¹。图2,3相对比,施加磷肥比钾肥对儿茶素含量增加更为显著,四年生唐古特大黄儿茶素含量明显高于三年生的,施加磷肥三年生唐古特大黄5月份儿茶素平均质量分数最高(38.78 mg·g⁻¹),7月份次之(27.75 mg·g⁻¹),10月份最少(16.81 mg·g⁻¹)。除2016年5月,与对照组(P0)相比较施加P2(4.5 g·m⁻² P₂O₅)梯度的磷肥均能提高儿茶素的含量,但是施加P3(9.0 g·m⁻² P₂O₅)水平磷肥儿茶素含量均降低,说明施加磷肥过多反而降低儿茶素的含量,施加不同梯度的钾肥对于儿茶素含量影响并不明显,也无明显规律。因此,以儿茶素含量为指标,唐古特大黄的采收期宜定于5月,宜施加磷肥4.5 g·m⁻² P₂O₅。根据文献[13-14]参考,淫羊藿以及川芎的采收期均为5月份,而以儿茶素为测定指标,与本研究结论一致。图中三、四年生唐古特大黄5月,7月儿茶素平均含量均大于20 mg·g⁻¹。因此建议唐古特大黄的儿茶素含量规定为不少于20%来完善对含量的检测标准。

3.3 年际间不同肥料梯度下唐古特大黄中儿茶素含量比较 由图4,5可知,2014年,2015年,2016年相同的10月份,3个生长年际间进行比较,随着生长年限的增加,施肥组唐古特大黄中儿茶素平均含量呈现增长的趋势。参考文献[15-17]随生长年限的增加黄芪、黄连及红豆杉中药用成分也随之增加,这与笔者的研究结果相一致。曹纬国等^[18]报道唐古特大黄中5种蒽醌衍生物的含量在1~3

年的生长期增加迅速,其中第2年增加尤为迅速,进入第4个生长年则增速减缓。通过实验探究可得,通过合理的施肥,四年生(2016年)施肥的唐古特大黄儿茶素的含量依然呈现增加的趋势。本试验结果是唐古特大黄移栽后三年内的生长状况,五年生甚至更多年生的唐古特大黄药材合理的施肥梯度还需要进一步深入探究。

[参考文献]

[1] 李莉. 不同道地产区大黄资源现状与药材质量特征及其形成机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2014.

[2] 王春霖. 大黄的研究进展[J]. 甘肃科技, 2013, 29(14):147-149.

[3] 王敬国, 袁海龙, 曲家伟, 等. 大黄的止血作用及其临床应用[J]. 药学实践杂志, 1994(3):204-205.

[4] 张铂, 王兵, 王勇强, 等. 大黄鞣质对组织损伤保护作用的研究进展[J]. 中国中医急症, 2015, 24(2): 286-287.

[5] 钟奋毓. 大黄在出血性疾病治疗中的应用[J]. 人民军医, 1993(12):58-59.

[6] WANG X M, REN Y. *Rheum tanguticum*, an endangered medicinal plant endemic to China[J]. J Med Plant Res, 2009, 3(13):1195-1203.

[7] 沈娜, 崔玉磊, 徐文华, 等. 种植密度和采收期对唐古特大黄生长发育和产量的影响[J]. 中药材, 2017, 40(6):1253-1257.

[8] 孙佩, 李敏, 杨小多, 等. HPLC法测定大黄药材和饮片中番泻苷A和番泻苷B的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2008, 31(3):51-53.

[9] SHEN N, CUI Y L, XU W H, et al. Impact of phosphorus and potassium fertilizers on growth and anthraquinone content in *Rheum tanguticum* Maxim. ex

Balf[J]. Ind Crop Prod, 2017, 107(15):312-319.

[10] Jha P, Ram M, Khan M A, et al. Impact of organic manure and chemical fertilizers on artemisinin content and yield in *Artemisia annua* L [J]. Ind Crop Prod, 2011, 33(2):296-301.

[11] 齐红, 王云, 郭庆梅, 等. 不同采收期皱皮木瓜质量动态分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 19-22.

[12] Pandey V, Patel A, Patra D D. Amelioration of mineral nutrition, productivity, antioxidant activity and aroma profile in marigold (*Tagetes minuta* L.) with organic and chemical fertilization [J]. Ind Crop Prod, 2015, 76(15):378-385.

[13] 陈翠萍, 沙明, 杨松松. 朝鲜淫羊藿中黄酮类成分在不同采收期的含量变化[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(2): 86-88.

[14] 刘金亮, 范巧佳, 郑顺林, 等. HPLC测定不同采收期川芎药材中5种药效成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9):1650-1655.

[15] 张善玉, 朴惠顺, 宋成岩. 不同生长年限黄芪中总皂苷、黄芪甲苷、总黄酮及多糖含量比较[J]. 延边大学医学学报, 2005, 28(2):87-89.

[16] 黄小平, 张毅, 钟国跃. 不同产地和生长年限黄连的总生物碱含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(1):42-43.

[17] 唐哲, 刘莉, 张玮. 不同部位及生长年限云南红豆杉中紫杉醇含量的测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(5):44-45.

[18] 曹纬国, 刘志勤, 绍赞, 等. 青海省道地药材唐古特大黄中4种蒽醌衍生物的含量测定[J]. 西北植物学报, 2004, 24(11):2140-2142.

[责任编辑 仝燕]