

RP-HPLC 测定五倍子 3 个炮制品中没食子酸和鞣花酸的含量

彭璐^{1,2}, 龚千锋^{1*}, 李小宁¹, 李尧尧^{2*}, 杨立新², 易红², 闫沛沛²

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:测定生五倍子、醋五倍子和百药煎中没食子酸与鞣花酸的含量,探讨不同炮制方法对这 2 种成分含量的影响。方法:收集五倍子药材生品 10 批,分别炮制得到生品、醋制品和百药煎饮片各 10 批。采用反相高效液相法测定各炮制品中没食子酸和鞣花酸的含量。色谱条件:Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 三氟乙酸(B),梯度洗脱,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,柱温 30 ℃。采用 SPSS 17.0 对测定结果进行分析,比较不同炮制品中各成分的含量差异。结果:生五倍子,醋五倍子,百药煎中没食子酸和鞣花酸平均质量分数分别为 20.19, 1.73; 74.26, 4.59; 236.11, 0.59 mg·g⁻¹。结论:醋炙法和发酵法均显著增加五倍子中没食子酸的含量($P < 0.01$),发酵法与醋炙法相比,没食子酸含量也具有显著性差异($P < 0.01$)。醋炙法可以增加五倍子中鞣花酸含量,差异具有统计学意义($P < 0.05$),发酵法则降低了鞣花酸的含量,差异无统计学意义。

[关键词] 五倍子; 炮制品; 高效液相色谱法; 没食子酸; 鞣花酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0076-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180076

Determination on Contents of Gallic Acid and Ellagic Acid in Three Kinds of Processed Pieces of Galla Chinensis by RP-HPLC PENG Lu^{1,2}, GONG Qian-feng^{1*}, LI Xiao-ning¹, LI Rao-rao^{2*}, YANG Li-xin², YI Hong², YAN Pei-pei² (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Institute of Chinese MateriaMedica, China Acedemy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the influence of different processing methods on contents of gallic acid, ellagic acid content according to the content of the two compounds in 10 batches of Galla Chinensis, vinegar gallnut and Chinese gall leaven, separately. **Method:** 10 batches of crude drugs of Galla Chinensis were collected. 10 batches of vinegar products and Chinese gall leaven were processed. The contents of the gallic and ellagic acid in different processed products were detected by RP-HPLC method. Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used. Mobile phase A was acetonitrile, mobile phase B was 0.1% three fluoride acetic acid. Gradient elute was used. Flow rate was set at 0.8 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 280 nm, the column temperature was set at 30 ℃. **Result:** The content of gallic acid and ellagic in raw materials, vinegar, fermentation were 20.19, 1.73; 74.26, 4.59; 236.11, 0.59 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The content of gallic acid in Galla chin can be increased by vinegar method and fermentation method significantly ($P < 0.01$), significantly. Fermentation method can raised the content of this component more significantly than vinegar method ($P < 0.01$). The content of ellagic acid can be raised in vinegar-process pieces significantly ($0.01 < P < 0.05$). The difference of the content of this compound between crude drug and fermentation pieces was not statistically significant.

[Key words] Galla Chinensis; processed piece; RP-HPLC; gallic acid; ellagic acid

[收稿日期] 20150616(012)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307001-002-010);北京市自然科学基金项目(7112097);江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC14B10)

[第一作者] 彭璐,在读硕士,从事中药炮制工艺与机制研究,Tel:0791-87118852,E-mail:646752384@qq.com

[通讯作者] * 龚千锋,教授,从事中药炮制工艺与机制研究,Tel:0791-87118852,E-mail:gongqf2006@163.com;

* 李尧尧,博士,副研究员,从事炮制品质量标准研究,Tel:010-64000576,E-mail:leeraoao@163.com

五倍子具有敛肺降火,涩肠止泻,敛汗止血,收湿敛疮功能^[1]。常用炮制方法有净制,炒制,醋制,发酵制(传统的百药煎)。《中国药典》2010 年版中五倍子的炮制方法仅记载了净制法,在《江西炮制规范》及《中药炮制学辞典》中均记载有醋蒸五倍子,醋蒸后酸性增加,增强收敛涩肠止泻的功能^[2-3]。传统的百药煎为五倍子和茶叶,适量的酵母通过一定的制作方法发酵而成的。

五倍子的主要成分为可水解鞣质,没食子酸是其单体化合物,鞣花酸是其二聚体。没食子酸具有抗菌抗炎抗氧化作用^[4-7],鞣花酸是一种天然氧化剂具有抗癌作用^[8-9]。目前已有报道高效液相测定五倍子中的没食子酸的含量^[10-12],而关于五倍子炮制品的报道较少。我们以没食子酸和鞣花酸含量作为化学指标,收集了 10 批五倍子药材,经过净制、醋炙、发酵制得到饮片各 10 批,分别测定这些饮片中这两个成分的含量,分析和探讨炮制方法对这两个成分含量的影响,结合相关文献探析其炮制原理,为五倍子的炮制规范,炮制品质量标准的制定提供科学依据。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPDM20A 型检测器,日本岛津),KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,250 W,20 kHz),CPA2250 型分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

五倍子原药购自安徽亳州,四川巴中,四川,湖北十堰,贵州,贵州真水,成都都江堰,陕西汉中,甘肃文县,江西樟树(样品编号依次为 1~10 号),经中国中医科学院中药研究所冯学锋研究员鉴定为五倍子蚜 *Melaphis chinensis* 寄生在漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis*,青麸杨 *R. potaninii* 或红麸杨 *R. punjabensis* var. *sinica* 叶上的虫瘿。

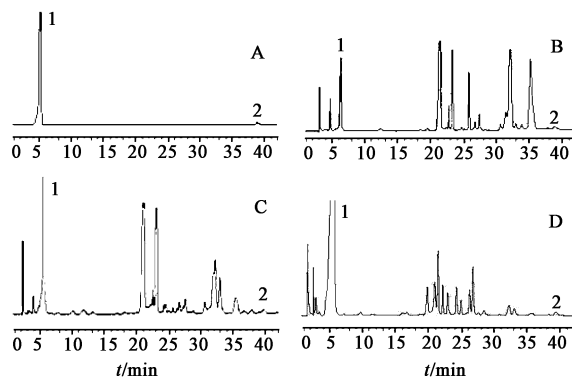
炮制方法 生五倍子^[2]:敲开虫瘿,拣净杂质,除去虫垢即得。醋蒸五倍子^[3]:取净五倍子,用米醋拌匀,置小甑内蒸 1 日至透,取出,晒干。五倍子每 100 g,用醋 20 g。百药煎^[13]:取净五倍子,洗净,干燥,研末,过 80 目筛,加入适量酒曲末,混匀,再加茶叶水,揉匀,切成小块,置适宜容器中,上盖湿布,放在温度湿度适宜的培养箱中发酵,待其表面全部长出白霜时取出,晒干(五倍子每 100 g,用酒曲 30 g,茶叶 1 g)。

炮制品的制备:取原药材 1~10 号,按照上述方法炮制,得到生五倍子 S1~S10,醋五倍子 C1~C10,百药煎 F1~F10。

没食子酸对照品(批号 110831-200803,购自中国食品药品检定研究院),鞣花酸对照品(购自深圳博泰康泰医药科技有限公司,批号 130810,供含量测定用,纯度 > 98%)。甲醇、乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯),三氟乙酸购自国药集团化学试剂有限公司,水为娃哈哈纯净水。酒曲购自广西桂林全州宝山酒曲厂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 KromasilC₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-含 0.1% 三氟乙酸水(B)梯度洗脱(0~8 min, 95% B; 8~14 min, 95%~90% B; 14~17 min, 90%~85% B; 17~26 min, 85% B; 26~42 min; 85%~80% B, 甲醇冲柱 10 min, 95% B 平衡 30 min)。流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 280 nm,进样体积 10 μL。见图 1。



A. 对照品; B. 生五倍子; C. 醋五倍子; D. 百药煎; 1. 没食子酸; 2. 鞣花酸

图 1 五倍子 3 个炮制品的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of three processed pieces of *Galla Chinese*

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取没食子酸、鞣花酸对照品适量,加甲醇溶解,配制成 0.106, 0.103 g·L⁻¹的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取各样品粉末(过一号筛)约 0.25 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,准确加入甲醇 25 mL,称重,超声 30 min,放置,待其冷却至室温,称重,用甲醇补减失的质量,摇匀,滤过,弃去初滤液,取续滤液,过微孔滤膜(0.2 μm)即得。

2.4 线性范围 分别取没食子酸、鞣花酸对照品适量,精密称定,置同一 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。依次进行等度稀释,得到没食子酸质量浓度为 5.069 6, 2.534 8, 1.267 4, 0.633 7, 0.316 9, 0.158 4, 0.079 2, 0.039 6 g·L⁻¹的溶液,鞣花酸质量浓度为 0.116 0, 0.058 0, 0.029 0, 0.014 5, 0.007 3,

0.003 6, 0.001 8, 0.000 9, 0.000 45, 0.000 225 g · L⁻¹ 的溶液, 每个浓度均进样 10 μL。以质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y) 制作标准曲线, 回归方程分别为 $Y = 2.79 \times 10^7 X + 1.01 \times 10^7$ ($r = 0.999 9$), $Y = 2.47 \times 10^7 X - 2.04 \times 10^4$ ($r = 0.999 9$)。表明没食子酸和鞣花酸的分别在 0.396 ~ 50.696, 0.002 25 ~ 1.16 μg 呈线性关系。鞣花酸的定量限为 2.25 ng。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度 取 S3 样品粉末 0.25 g, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 每次进样量 10 μL, 结果没食子酸和鞣花酸的峰面积, RSD 分别为 0.1%, 0.4%, 表明该方法精密度较好。

2.5.2 稳定性 取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 3, 5, 7, 12, 24 h 进样, 进样量 10 μL, 结果没食子酸和鞣花酸的峰面积 RSD 分别为 1.0%, 1.5%, 表明该样品在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性 取 S3 样品粉末 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 按 2.3 项下制备供试品, 测定并计算没食子酸和鞣花酸的质量分数分别为 38.32, 0.93 mg · g⁻¹, RSD 分别为 1.7%, 3.0%, 表明该样品制备方法重复性较好。

2.5.4 加样回收率 取 S3 样品粉末 6 份(已知没食子酸和鞣花酸含量分别为 38.32, 0.93 mg · g⁻¹), 每份约 0.125 g, 精密称定, 分别准确加入没食子酸和鞣花酸对照品适量, 按 2.3 项下操作, 测定含量并计算回收率, 结果见表 1。

2.6 样品测定与统计学处理 取各批样品, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下方法进行 HPLC 分析, 根据峰面积计算供试品中没食子酸和鞣花酸的含量, 结果见表 2。

采用 SPSS 17.0 对上述测定结果进行统计分析, 结果见表 3。

从表 3 可以看出, 醋炙法和发酵法可显著增加五倍子中没食子酸的含量, 具有统计学差异。发酵法与醋炙法相比, 没食子酸含量也具有显著性差异。醋炙法可以增加五倍子中鞣花酸含量, 具有统计学差异, 发酵法则降低了鞣花酸的含量, 但无差异。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 比较了多个流动相系统(甲醇-水, 甲醇-酸水, 乙腈-水, 乙腈-酸水), 多个流速(0.6, 0.8, 1.0 mL · min⁻¹), 多个酸水比例, 多个柱温(25, 30, 37℃), 根据色谱的数目、面积、分离度、基线等, 最终确定流动相系统为乙腈-0.1% 三氟

表 1 不同炮制品中没食子酸和鞣花酸回收率试验

Table 1 Recovery result of gallic acid and ellagic acid in three different processed pieces

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率 /%	RSD /%
没食子酸	0.125 6	4.812 8	4.816 1	9.463 8	96.04	1.1
	0.125 5	4.809 0	4.816 1	9.361 5		
	0.125 8	4.820 5	4.816 1	9.444 3		
	0.125 5	4.809 0	4.816 1	9.400 0		
	0.125 7	4.816 6	4.816 1	9.463 8		
	0.125 7	4.816 6	4.816 1	9.510 1		
	鞣花酸	0.125 6	0.117 3	0.110 6	0.233 8	101.20
	0.125 5	0.117 2	0.110 6	0.222 0		
	0.125 8	0.117 5	0.110 6	0.227 0		
	0.125 5	0.117 2	0.110 6	0.231 4		
	0.125 7	0.117 4	0.110 6	0.226 6		
	0.125 7	0.117 4	0.1106	0.234 7		

表 2 生五倍子、醋五倍子和百药煎中 2 种成分含量测定 (n=3)

Table 2 Determination of two component content in Galla Chinese, vinegar gall and Chinese gall leaven (n=3)

No.	没食子	鞣花酸	No.	没食子	鞣花酸
S1	20.65	0.45	C6	66.57	2.62
S2	28.90	5.34	C7	62.38	0.50
S3	38.32	1.06	C8	90.18	5.02
S4	27.99	3.96	C9	59.69	4.07
S5	15.48	1.03	C10	91.79	9.21
S6	15.36	0.14	F1	257.97	0.23
S7	13.98	0.31	F2	283.24	0.13
S8	16.23	1.25	F3	254.27	1.29
S9	12.44	2.32	F4	242.22	1.85
S10	12.58	1.38	F5	251.23	0.54
C1	62.64	2.00	F6	303.81	0.14
C2	81.84	8.75	F7	170.55	0.04
C3	63.24	3.72	F8	281.43	0.26
C4	56.82	6.56	F9	153.30	1.31
C5	107.41	3.46	F10	163.03	0.07

乙酸, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C。通过全波长扫描, 2 个对照品色谱峰在 280 nm 均有最大吸收, 因此选择 280 nm 为检测波长。

3.2 供试品制备方法的考察 考察了 50% 甲醇, 75% 甲醇和甲醇 3 个提取溶剂, 依次进行 HPLC 分析, 结果显示 75% 甲醇和甲醇对 3 个炮制品的提取率均为最高, 由于 75% 甲醇提取时, 醋制品和发酵

表3 3种炮制品中没食子酸和鞣花酸的含量分析($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Analysis of Contents of gallic acid and ellagic acid in three processed pices($\bar{x} \pm s, n = 10$)

品种	没食子酸	鞣花酸
生品	20.19 ± 8.71	1.73 ± 1.69
醋品	74.26 ± 17.29 ²⁾	4.59 ± 2.83 ¹⁾
百药煎	236.11 ± 54.19 ²⁾	0.59 ± 0.65

注:与生品比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

品目标色谱峰的分离度较差,因此我们最终选择甲醇为提取溶剂。比较了不同的超声时间(15,30,45 min),结果表明超声30 min和45 min提取率均较高,二者之间无显著性差异,因此我们选择超声30 min。

3.3 结果分析 本文使用HPLC法测定不同产地不同炮制品没食子酸和鞣花酸的含量,观测产地、炮制对五倍子带来的影响。从表2数据中可以看出与生品比较,五倍子经过醋蒸后,没食子酸含量增加,多达3~7倍多,鞣花酸也相应的增加。与醋蒸五倍子比较,发酵五倍子没食子酸增加更显著,多达12倍之多,而鞣花酸的含量有所减少。传统炮制认为醋蒸五倍子,收敛性增强;发酵五倍子经发酵,抗菌作用显著增强^[5]。现代研究表明没食子酸、鞣花酸具有显著的抗菌抗炎抗氧化作用。传统炮制品临床疗效变化很可能与没食子鞣花酸增加有关。

中药炮制能改变中药的功效,功效与物质的化学成分息息相关。通过主成分含量及变化情况等的客观指标,为炮制工艺、饮片标准的统一制定提供科学数据。五倍子醋制后收敛性增强,发酵五倍子经发酵,其性浮收,味带余甘,治上焦心肺咳嗽,痰饮等^[14],应该与炮制过程中多个成分之间的变化和转化有关,我们将进一步的研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 62.

[2] 叶定江, 原思通. 中药炮制学辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 2005: 497.

[3] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海: 上海科技出版社, 2008: 557-558.

[4] Ji H F, Zhang H Y, Shen L. Proton dissociation is important to understanding structure-activity relationships of gallic acid antioxidants[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(15): 4095-4098.

[5] Ana Aguilar-Galvez, Giuliana Noratto. Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds [J]. Food Chem, 2014, 156: 301-304.

[6] Yoon C H, Chung S J, Lee S W, et al. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. Sci Direct, 2013, 80(3): 274-279.

[7] Sun J, Li Y Z, Ding Y H, et al. Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunctions *in vitro* and cerebral ischemia/reperfusion injury *in vivo* [J]. Brain Res, 2014, 1589: 126-139.

[8] Gonzalez-Sarrias A, Tome- Carneiro J. The ellagic acid-derived gut microbiota metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cell [J]. Food Funct, 2015, 6(5): 1460-1469.

[9] 于娅, 李利民, 潘嘉, 等. 鞣花酸抗 S180, H22 肿瘤及其抑制新生血管机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 21(8): 145-150.

[10] 郭小瑞, 孙哲, 王添敏, 等. 基于色谱指纹图谱的五倍子定量测定方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 137-140.

[11] 刘起中, 张可可. HPLC法测定五倍子中没食子酸的含量[J]. 中草药, 2012, 33(5): 427-428.

[12] 钟永红, 钱琳. 高效液相色谱法测定复方五倍子液中没食子酸的含量[J]. 医学临床研究, 2011, 28(2): 325-326.

[13] 叶定江. 中药炮制学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 743-744.

[14] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1985: 402-403.

[责任编辑 顾雪竹]