

- 2002, 13(4): 233.
- [3] 晏媛, 郑萍. 续断的药理学研究进展[J]. 中医药研究, 2002, 18(5): 53.
- [4] 钟美英, 申玉华. 川续断的研究现状[J]. 中医药导报, 2008, 14(6): 137.
- [5] 卫莹芳, 刘永, 谢达温. 不同产地续断的质量比较[J]. 华西药理学杂志, 2010, 25(2): 173-174.
- [6] 刘永, 卫莹芳, 闫婕. 不同产地续断中总皂苷的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2767-2768.
- [7] 李敬芝, 张春风, 杨中林. HPLC 法测定续断药材中常春藤皂苷元的含量[J]. 中医学报, 2011, 39(6): 62-64.
- [8] 马双成, 刘燕, 毕培曦, 等. RP-HPLC 法测定金银花药材中常春藤皂苷元及齐墩果酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 886.
- [9] 毛红梅, 平欲晖, 宗星星, 等. HPLC 同时测定败酱草中常春藤皂苷元齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 89-92.
- [10] 杨紫刚, 丁鲲, 许刚, 等. 续断化学成分研究[J]. 中药材, 2012, 35(11): 1789-1792.
- [11] 吴帅, 刘二伟, 张祎, 等. 川续断中化学成分的研究[J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29(3): 147-150.
- [12] 谭鄂丽, 李敏, 吴蜀瑶, 等. HPLC 法测定川桐皮中常春藤皂苷元的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(5): 68-70.
- [13] 何宇新, 马育彪, 李玲. 反相高效液相色谱法测定不同产地无患子药材中常春藤皂苷元的含量[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2189-2190.
- [14] 郑光浩, 裴晓玲, 金研. 兴安白头翁常春藤皂苷元的含量测定[J]. 延边大学医学学报, 2012, 35(1): 30-33.
- [15] 卢永翎, 于艏, 朱婷婷. 七叶莲中特征成分常春藤皂苷元及齐墩果酸的测定研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 1945-1949.
- (编辑: 修春)

没食子不同提取部位没食子酸和总鞣质的含量比较研究

杨建华^{1,2}, 周言², 柳惠斌², 张虎³, 胡君萍³ (1. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 比较没食子不同制备部位没食子酸和总鞣质的含量。方法 以没食子酸为对照品, 分别采用 HPLC 法、干酪素比色法测定没食子药材、没食子不同制备部位没食子酸和总鞣质的含量。结果 没食子药材样品中没食子酸和总鞣质含量分别为 5.76 % 和 42.85 %, 各不同制备部位没食子酸和总鞣质含量分别为 2.23 %~54.60 % 和 17.68 %~63.53 %。结论 没食子不同制备部位中没食子酸和总鞣质的含量差异明显, 该研究为没食子药材的进一步开发和利用提供了数据支持。

关键词: 没食子; 没食子酸; 鞣质; 制备部位

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)06-0609-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.021

Content Comparison of Gallic Acid and Total Tannins in Different Preparative Fractions from *Turkish galls*

YANG Jianhua^{1,2}, ZHOU Yan², LIU Huibin², ZHANG Hu³, HU Junping³ (1. The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011 Xinjiang, China; 2. Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011 Xinjiang, China; 3. Pharmacy College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011 Xinjiang, China)

Abstract: Objective To compare contents of gallic acid and total tannins in different preparative fractions from *Turkish galls*. **Methods** With the gallic acid as reference, the contents of total tannins and gallic acid in the medicinal material of *Turkish galls* and its different preparative fractions were determined by high performance liquid

收稿日期: 2013-05-25

作者简介: 杨建华, 男, 博士, 主任药师, 研究方向: 天然药用资源的研究与开发。Email: yjh-yft@163.com。通讯作者: 胡君萍, 博士, 教授, 研究方向: 天然药用资源研究。Email: hjp-yft@163.com。

基金项目: 新疆高校科研计划重点项目(XJEDU2010I32)。

chromatography and ultraviolet spectrophotometer, respectively. Results The contents of gallic acid and total tannins in the medicinal material of *Turkish galls* were 5.76 % and 42.85 %, respectively. The content range of gallic acid and total tannins in different preparative fractions from *Turkish galls* were 2.23 ~54.60 % and 17.68 ~63.53 %, respectively. **Conclusion** The contents of gallic acid and total tannins vary in different preparative fractions from *Turkish galls* greatly, which will provide a scientific basis for the rational exploitation and utilization of *Turkish galls*.

Keywords: *Turkish galls*; Gallic acids; Tannins; Preparative fractions

没食子 *Turkish galls* 为没食子蜂科昆虫没食子蜂的幼虫寄生于壳斗科植物没食子树幼枝上产生的干燥虫瘿,是维吾尔医学传统习用药材,具有固涩收敛、益血生精、止血消炎等功效,临床主要用于大肠虚滑、泻痢不止、习惯性肠炎、疮疡出血等症的治疗^[1-2]。没食子富含鞣质、没食子酸、丙酸及树脂等,其中没食子鞣质和没食子酸是其主要有效成分^[1]。现代研究^[3-7]表明,没食子具有抑菌、杀菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、抗辐射等药理活性,具有较大的开发和应用价值。目前,有关没食子的研究报道较少,更少涉及到其不同提取部位的质量控制研究。为了进一步提高没食子药材的资源利用率,本研究采用相关提取分离技术制备了没食子不同提取部位,并以没食子酸和没食子总鞣质为考察指标,分析了它们在不同提取部位中的含量,为其合理的开发和利用提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 2550 紫外分光光度计,日本岛津公司; ACQUITY 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; S-114 电子天平,赛多利斯丹佛仪器有限公司; R-3 旋转蒸发仪,瑞士步琪 BUCHI 公司; 1001 型冷冻干燥机,美国 Edwards Pirani 公司; HHS 型电热恒温水浴锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂; SHB-III 型循环式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司; KQ-200VDB 型双频数控超声波振荡仪,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试药 没食子药材购自新疆维吾尔自治区维吾尔医医院,经新疆医科大学药学院帕丽达教授鉴定为壳斗科植物没食子树幼枝上的干燥虫瘿 *Turkish galls*; 没食子酸对照品,中国药品生物制品检定所,批号: 110831-200302; ODS 40~75 μm 反相硅胶, Fuji Sliysa 公司; MCI GEL 75~150 μm 树脂,日本三菱公司; 水为重蒸水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 没食子不同提取部位的制备 取没食子药材适量,粉碎,用 3 倍体积丙酮浸泡 2 h, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热回流 3 次(3 h, 3 h, 2 h),合并滤液,减压浓缩,冷冻干燥得没食子丙酮提取部位(干粉得率为 76.3 %)。称取丙酮提取部位干燥粉末适量加水混悬,依次以乙醚和乙酸乙酯萃取,所得乙酸乙酯浸膏经 MCI 树脂柱层析,以水-乙醇体系梯度洗脱,其中,40 %乙醇洗脱流分为其主要流分段(浸膏干粉得率 60.2 %)。对 MCI 40 %洗脱流分段的冷冻干燥粉末进一步系统分离,加水适量混悬,经 ODS 柱层析,以水-甲醇体系梯度洗脱,分别得水、30 %、50 %、70 %甲醇洗脱流分段,减压浓缩,冷冻干燥得不同流分干燥粉末。没食子丙酮提取物、MCI 40 %乙醇洗脱流分、ODS 水洗脱流分、ODS 30 %甲醇洗脱流分、ODS 50 %甲醇洗脱流分、ODS 70 %甲醇洗脱流分等不同制备部位的得率,见表 1。

2.2 总鞣质的含量测定^[8]

2.2.1 没食子药材供试品溶液的制备 精密称取没食子药材粉末(过 2 号筛) 0.1 g,置于 100 mL 棕色容量瓶中,加水适量,超声振荡 15 min,放凉后加水定容至刻度。精密量取 2 mL,用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 不同制备部位供试品溶液的制备 分别精密称取没食子丙酮提取物、MCI 40 %乙醇洗脱部位、ODS 不同洗脱部位的干燥粉末(过 2 号筛)各 10 mg,置 100 mL 棕色容量瓶,加水适量,超声(功率 200 W,频率 400 kHz)溶解 15 min,放凉后加水定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 5 mg,置 100 mL 棕色容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,分别置 25 mL 棕色量瓶中,各加入磷钼钨酸试液 1 mL,再分别加水 11.5,

11.0, 10.0, 9.0, 8.0, 7.0 mL, 用 29 %碳酸钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置 30 min, 以相应的试剂为空白, 按照紫外-可见光光度法(2010 版《中华人民共和国药典》一部, 附录 VA), 在 760 nm 的波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 100.06X + 0.114$ ($r = 0.9987$), 结果表明, 没食子酸在 $1 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.2.5 总酚的含量测定 分别精密量取 2 mL 样品供试品溶液, 置 25 mL 棕色量瓶中, 按照 2.2.4 标准曲线制备项下方法, 自加入磷钼钨酸试液 1 mL 起, 加水 10 mL, 同法测定吸光度值, 从标准曲线中读取供试品溶液中没食子酸的含量, 再根据稀释倍数计算, 即得。

2.2.6 不被吸附多酚的含量测定 精密吸取各个供试品溶液 25 mL, 置已装有 0.6 g 干酪素(精密称定)的 100 mL 具塞锥形瓶中, 密塞, 放入 30 ℃水浴中保温 1 h, 时时振摇, 取出, 放冷, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密吸取续滤液 2 mL, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 按照 2.2.4 标准曲线制备项下方法, 自加入磷钼钨酸试液 1 mL 起, 加水 10 mL, 同法测定吸光度值, 从标准曲线中读取供试品溶液中没食子酸的含量, 再根据稀释倍数计算, 即得。

2.2.7 总鞣质含量的计算 鞣质为可被干酪素吸附的多酚, 计算公式: 鞣质含量=总酚含量-不被吸附多酚含量。各不同制备部位总鞣质含量存在明显的差异。药材经丙酮提取, MCI(40 %甲醇)、ODS(30 %、50 %、70 %甲醇)柱层析后总鞣质含量均有明显的提高, 仅 ODS 水洗脱部位含量低于原药材, 结果见表 1。

表1 样品含量测定结果($n=3$)

Table 1 Content determination results of samples			
待测样品	浸膏得率/%	总鞣质/%	没食子酸/%
没食子药材	-	42.85	5.76
丙酮提取部位	76.3	53.62	7.52
MCI 40 %乙醇洗脱部位	60.2	63.53	4.02
ODS 水洗脱部位	7.7	17.68	54.60
ODS 30 %甲醇洗脱部位	36.6	61.14	2.49
ODS 50 %甲醇洗脱部位	12.7	63.19	3.28
ODS 70 %甲醇洗脱部位	17.2	60.93	2.23

2.3 没食子酸的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil-ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2 %乙酸溶液(10 : 90, pH 3.78); 检测波长: 273 nm; 柱温: 室

温; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 5 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取 105 ℃干燥至恒重的没食子酸对照品适量, 至 25 mL 棕色容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 制成 $0.272 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取没食子药材、没食子丙酮提取物、MCI 40 %乙醇洗脱部位、ODS 不同洗脱部位的干燥粉末(过 2 号筛)各 1.0 mg, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 加水适量, 超声(功率 200 W, 频率 400 kHz)溶解 15 min, 加水至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 线性范围考察 精密吸取没食子酸对照品的贮备溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别放置于 10 mL 的棕色量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 各吸取 5 μL 注入超高效液相色谱仪, 以对照品含量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得线性方程为 $Y = 1.955 \times 10^6 X - 2.080 \times 10^4$ ($r = 0.9991$), 结果表明, 没食子酸在 $0.0136 \sim 0.136 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 精密吸取没食子酸对照品溶液 5 μL, 连续进样 5 次, 按照峰面积计算, RSD 为 1.3 %, 表明进样与色谱检测的精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 结果其峰面积的 RSD 为 2.6 %, 表明样品溶液在 8 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 取没食子药材样品 6 份, 按 2.3.3 供试品溶液的制备项下方法制备, 进样, 记录峰面积, 其 RSD 为 1.9 %, 表明方法重复性较好。

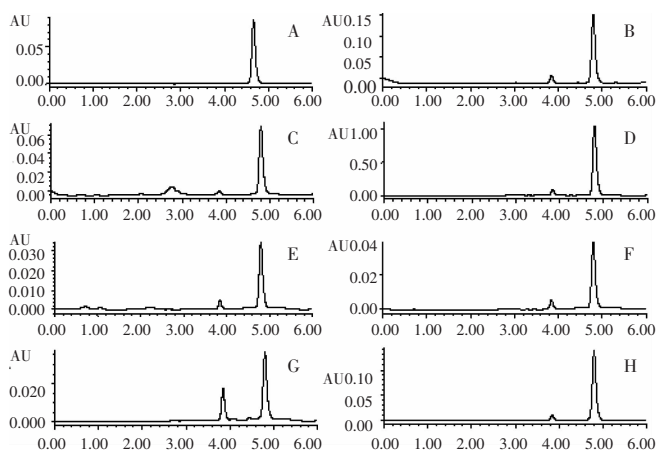
2.3.8 加样回收率试验 取已测得含量的没食子药材样品 6 份, 分别精密加入一定量的没食子酸对照品溶液, 按 2.3.3 供试品溶液的制备项下方法制成供试品溶液, 分别进样 5 μL, 测定峰面积, 计算平均回收率为 97.3 %, RSD 为 2.5 %, 结果见表 2。

表2 没食子酸回收率试验结果($n=6$)

Table 2 The results of recovery test						
编号	样品量/mg	加标量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1.0036	0.0544	0.1121	99.8	97.3	2.5
2	1.0024	0.0544	0.1098	95.7		
3	1.0004	0.0544	0.1095	95.4		
4	1.0058	0.0544	0.1102	96.1		
5	1.0029	0.0544	0.1127	100.9		
6	1.0013	0.0544	0.1099	96.1		

2.3.9 供试样品含量测定 分别精密吸取对照品和供

试样品溶液 5 μ L, 注入超高效液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。以外标法计算没食子酸的含量, 结果见表 1。由表 1 数据可知, 除 ODS 水洗脱部位和丙酮提取部位外, 其余制备部位的没食子酸含量均有所降低, 并且 ODS 水洗脱部位没食子酸含量远高于其他制备部位。



A. 没食子对照品; B. 没食子丙酮提取物; C. MCI 40 %乙醇洗脱流分; D. ODS 水洗脱流分; E. ODS 30 %甲醇洗脱流分; F. ODS 50 %甲醇洗脱流分; G. ODS 70 %甲醇洗脱流分; H. 没食子药材

图 1 对照品及样品色谱图

Figure 1 UPLC chromatograms of reference substance and samples

3 讨论

没食子中含有大量可水解鞣质, 水、甲醇、乙醇、丙酮等极性溶媒对其均有较好的溶解性质。有文献选用水或高浓度甲醇作为提取溶剂, 本文在预试验中也比较了不同种类的极性溶剂对没食子总鞣质提取的影响, 结果显示, 以丙酮为提取溶剂, 总鞣质含量虽略低于水或甲醇提取部位, 但在产品出膏率方面具有明显的优势, 加之没食子鞣质的热不稳定性高, 故选择沸点最低的丙酮为提取溶媒。

MCI 和 ODS 是分离制备水溶性天然产物的新型高分子填料, 其中 MCI 为微孔树脂, 分离原理与大孔树脂相似, 其分离效果比大孔树脂好很多, 天然产物分离制备时通常先用 MCI 进行分离, 再用 ODS 细分, 往往可以达到很不错的效果。本文选用这 2 种分离材料对没食子丙酮提取物做了进一步系统分离, 得到了没食子不同提取部位。使用 MCI 柱层析时, 以水-甲醇梯度洗脱(0 %、20 %、40 %、60 %、80 %、100 %甲醇), 除 40 %甲醇洗脱部位外, 其余洗脱流分干粉得率均很低(2.2 %~6.5 %), 故仅对 MCI 40 %甲醇洗脱部位采用 ODS 进行了进一步分离。对没食子药材的质量控制研究已有报道, 本研究结果与文献

报道的没食子药材中的没食子酸和总鞣质的含量测定结果基本一致^[9-10]。但尚未见对没食子不同制备部位有效成分的质量控制研究, 根据本研究的测定结果, 不同制备部位没食子酸和总鞣质的含量差异明显, 药材经丙酮提取, MCI(40 %甲醇洗脱)、ODS(30 %、50 %、70 %甲醇洗脱)柱层析后总鞣质含量均有明显提高, 仅 ODS 水洗脱部位含量低于原药材。不同制备部位没食子酸的含量差异则更加明显, 除 ODS 水洗脱部位和丙酮提取部位外, 其余制备部位没食子酸含量均有所降低。以往对没食子有效成分的含量比较主要集中于对不同提取溶媒、不同提取方法的研究, 本研究结果表明对没食子提取物进行进一步的分离是完全必要的。

没食子酸和没食子鞣质是没食子最主要的有效成分, 本研究显示, 丙酮提取物经 MCI 柱层析(40 %甲醇洗脱)后, 总鞣质含量有明显提高, 而 MCI 40 %甲醇洗脱部位经 ODS 柱层析后, 总鞣质含量还略有下降, 故如仅以提高总鞣质含量为目的, 则只需对没食子丙酮提取物经 MCI 柱层析即可。ODS 水洗脱部位是没食子酸高度富集的部位(含量高达 54.6 %), 接近原药材的 10 倍, 因此, 可作为纯化制备没食子酸单体的原料。

参考文献:

- [1] 候惠婵, 梁前, 卢迅聪. 五倍子、没食子中没食子酸的含量测定[J]. 中国药品标准, 2005, 6(3): 38-39.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 2000: 1169.
- [3] 赵今, 牛巧丽, 李艳, 等. 没食子及提取物对主要致龋细菌生长的实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(1): 1-2.
- [4] Kamijo M, Kanazawa T, Funaki M, et al. Effects of Rosa rugosa petals on intestinal bacteria[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(3): 773-777.
- [5] 刘跃民, 哈木拉提·吾甫尔, 包力. 没食子提取物诱导乳腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(8): 1702-1703.
- [6] 杨建华, 胡君萍, 张燕, 等. 维药没食子提取物抗辐射作用研究[J]. 中药材, 2010, 33(4): 599-602.
- [7] Cerda B, Llorach R, Ceron JJ, et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice[J]. Eur J Nutr, 2003, 42(1): 18-28.
- [8] 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, 2010: 附录 XB62.
- [9] 马萍萍, 聂继红, 李志红, 等. 没食子提取工艺的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(10): 1205-1207.
- [10] 任源. 没食子化学成分及溃结安灌肠剂的研究[D]. 新疆: 新疆医科大学, 2005.

(编辑: 宋威)