

基于不同地理种源头花蓼中没食子酸的含量分析

周涛* ,艾强 ,王彦君 ,江维克 ,金艳蕾 ,魏升华
(贵阳中医学院实验中心 ,贵阳 550002)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定头花蓼中没食子酸含量方法,测定评价 48 个不同地理种源样品。方法:反相高效液相色谱法, XB-18 C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 磷酸溶液 (4:96), 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 220 nm, 分别测定头花蓼 48 个不同地理种源 229 株样本, SPSS17.0 分析结果。结果:没食子酸线性范围进样量在 10.24 ~ 102.40 ng, $r = 0.9999$, 平均回收率 97.32%, RSD 0.52%。所测定样本单株没食子酸含量 0.5946% ~ 0.1475%, 居群间含量 0.1313% ~ 0.3306%。结论:该方法可准确测定头花蓼中没食子酸含量。在头花蓼不同地理种源中, 野生居群间和居群内的没食子酸含量差异较大。

[关键词] 头花蓼;地理种源;没食子酸;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)01-0049-04

Quality Evaluation and Analysis of *Polygonum capitatum* Based on Different Germplasm Resources

ZHOU Tao* , AI Qiang , WANG Yan-jun , JIANG Wei-ke , JIN Yan-lei , WEI Sheng-hua
(Guiyang Collage of Traditional Chinese Medicine , Guiyang 550002 , China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simple , accurate method of HPLC to determine the gallic acid content of *Polygonum capitatum* , and to analysis 48 populations in different germplasm resources. **Method:** The method was developed with the condition as follows: XB-18 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm , 5 μm) , acetonitrile-0.4% phosphoric acid (4:96) as the mobile phase with the speed of 0.8 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was 220 nm. Gallic acid was detected in 48 populations with 229 samples. **Result:** The linear range of gallic acid was 10.24-102.40 ng ($r = 0.9999$) with the average recoveries of 97.32% , RSD 0.52% . The gallic acid content was 0.5946% - 0.1475% in every sample , and was 0.1313% - 0.3306% during 52 populations. **Conclusion:** The method is simple , specific , and suitable for the determination of the gallic acid content in *P. capitatum*. There are some differences in gallic acid contents during populations and within populations , especially , it was significant differences in some populations , such as Yunnan-tengcong , Guizhou-taijiang , Guizhou-nayong , Guizhou-yuqing , Guizhou-qinglong and Guizhou-bijie. It had higher contents of gallic acid in Taijiang-laodun , Nayong-yangchang , Yuqing-baini , Shibing-niudachang populations , Guizhou province , and they should continue to study as suitable growth areas for artificial cultivation of *P. capitatum*.

[Key words] *Polygonum capitatum*; germplasm resources; gallic acid; HPLC

[收稿日期] 2010-04-26

[基金项目] 贵州省科技厅中药现代化项目 (黔科合社字 [2009]5029); 贵州省科技重大专项计划 (黔科合重大专项字 20080620); 贵州省教育厅自然科学研究项目 (黔教科 2008026)

[通讯作者] * 周涛, E-mail: taozhou88 @ 163.com , Tel: 13985175215

头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch-Ham. ex D. Don 为蓼科植物^[1], 以全草入药, 为贵州苗族所习用, 对于治疗泌尿系统疾病具有显著疗效^[2]。自 20 世纪 90 年代以来, 经过一系列的基础和开发利用研究, 头花蓼已成为贵州民族药代表, 并于 1998 年实现了 GAP 规范化种植^[3]。但由于头花蓼的栽培种源缺乏, 规模繁殖和试种品种单一, 随着大面积栽培推广, 现

在人工种植上不仅存在连作障碍,而且一些栽培产区的头花蓼药材产量和质量下降通过对不同产区、不同来源的头花蓼资源进行迅速有效的分析评价后,从中筛选优良种质,最终实现头花蓼的良种培育。

化学和药理研究认为,头花蓼的活性成分主要为黄酮类、鞣酸等^[4-5],杨立勇、王祥培等^[6-9]运用 HPLC 测定了不同产地头花蓼中槲皮苷、没食子酸的含量。本文利用 HPLC 建立头花蓼中没食子酸的含量测定方法,针对来自不同地理种源的样本进行全面分析评价,目的是为头花蓼具有优良种质资源的品种选育提供依据,同时也为进行头花蓼的种植等级区划研究打下基础。

1 材料

选择头花蓼在贵州、云南具有典型分布的 18 个县级地区,确立 48 个地方居群,其中包括了野生群体 43 个、栽培群体 3 个、栽培逃逸为野生群体 2 个。在头花蓼药材成熟期(2009 年 7~8 月)进行集中采样。每居群在选定 5 m×5 m 样地的范围内,随机采集隔离明显的成年植株 5~6 个,共 229 个个体。每个样本 40℃ 及时烘干、粉碎、密封保存。标本由贵阳中医学院生药教研室江维克副教授鉴定,保存于贵阳中医学院生药室。

2 仪器与试剂

岛津 LC-10 ATvp, SPD-6A 紫外-可见检测器,南宁威玛龙色谱工作站(版本:WML 2010 V5.23),岛津 CS-light 中文色谱数据工作站;HT-220A 色谱柱恒温箱;岛津 AUW220 型(分度值 0.01 mg)电子天平;电热恒温水浴锅(北京长源实验设备厂)。

没食子酸对照品,批号 110831-200302(中国药品生物制品检定所,含量测定用),甲醇和乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其余为分析纯试剂。头花蓼药材,晾干,粉碎成细粉供检测用。

3 方法与结果

3.1 色谱条件 上海月旭 XB-18 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm 5 μm);流动相为乙腈-0.4% 磷酸水溶液(4:96),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30℃,检测波长为 220 nm。在此条件下没食子酸与其他组分均能达到基线分离。见图 1。

3.2 试液的配制

3.2.1 对照品储备液配制 精密称取对照品 12.80 mg,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得没食子酸对照品储备液(0.256 g·

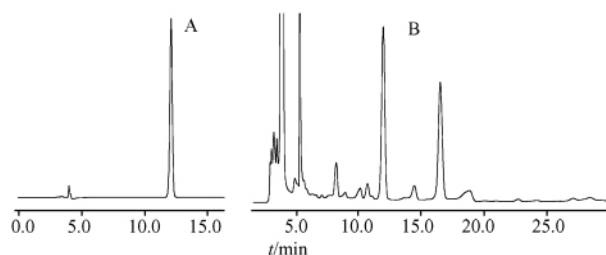


图 1 头花蓼中没食子酸色谱图(A. 对照品; B. 样品)

L⁻¹)。精密吸取对照品储备液 2 mL,置 50 mL 的量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得没食子酸对照品溶液(10.24 mg·L⁻¹)。

3.2.2 样品溶液制备 取 0.5 g 头花蓼细粉,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 甲醇-盐酸溶液(4:1)混合溶液,称定质量,水浴加热回流 3 h,放冷,称重,用甲醇-盐酸溶液(4:1)混合溶液补足减失的质量,摇匀,过滤,精密吸取 10 mL 续滤液至 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液为供试品溶液。

3.3 方法学试验

3.3.1 线性关系考察 分别精密量取上述对照品储备液 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.0 mL 分别置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制得没食子酸为 2.048, 6.144, 10.240, 14.336, 18.432, 20.480 mg·L⁻¹ 的溶液。分别吸取 5 μL 注入液相色谱仪,测定。结果表明,没食子酸在进样量(X)10.24~102.40 ng 与峰面积(Y)呈现良好的线性关系。回归方程 Y = 9.00 × 10³ X - 2.2 × 10², r = 0.999 9。

3.3.2 精密度试验 精密吸取质量浓度为 10.24 mg·L⁻¹ 没食子酸溶液 5 μL,重复进样 6 次,记录峰面积,结果峰面积的 RSD 0.66%,表明具有良好的精密度。

3.3.3 稳定性试验 精密称取头花蓼细粉 0.506 3 g,按 3.2.2 制备供试品溶液,室温下分别放置 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 h,进样测定,记录峰面积,结果峰面积 RSD 1.05%,表明在室温下 10 h 内稳定性良好。

3.3.4 重复性试验 按 3.2.2 方法分别制备 6 份供试品溶液并进行测定,结果样品平均含量为 0.922 mg·g⁻¹,6 次测定含量的 RSD 1.46%,说明重现性良好。

3.3.5 加样回收率试验 精密称取已测定没食子酸含量的头花蓼细粉 0.25 g,加入没食子酸对照品

适量,按 3.2.2 方法分别制备 6 份供试品溶液并进行测定,结果表明没食子酸的平均回收率为 97.32%,6 次回收率试验的 RSD 为 0.52%,说明本法测定没食子酸具有良好的回收率。见表 1。

3.4 没食子酸含量测定 按 3.3 确定方法和条件测试贵州 48 个不同地理种源头花蓼单株样品共 229 份。结果见表 2。

表 1 头花蓼没食子酸的加样回收率

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.245 5	0.226 4	0.448 9	96.57	97.32	0.52
2	0.257 8	0.237 7	0.461 2	97.01		
3	0.256 8	0.236 8	0.459 5	97.57		
4	0.257 9	0.237 8	0.461 7	97.18		
5	0.260 1	0.239 8	0.465 6	98.00		
6	0.258 5	0.238 3	0.463 2	97.61		

注:样品中加入没食子酸量均为 0.922 0 mg。

表 2 不同地理居群头花蓼没食子酸含量及 SPSS 分析*

居群号	地理位置	海拔 /m	样本数 /株	没食子酸平均含量 /%	\bar{X}	标准差	标准误	最小值	最大值
POP1	盘县四格乡	193 3	4	0.183 4	0.183 4	0.005 1	0.002 6	0.176 2	0.188 1
POP2	盘县洒基镇	170 5	5	0.174 2	0.174 2	0.051 8	0.023 1	0.104 5	0.243 3
POP3	盘县柏果镇	151 6	5	0.176 4	0.176 4	0.044 8	0.020 0	0.129 7	0.248 7
POP4	盘县盘江镇老屋基村	1571	5	0.177 2	0.177 2	0.045 1	0.020 1	0.116 0	0.225 1
POP5	盘县板桥镇落水坑村	170 5	5	0.180 5	0.180 5	0.034 2	0.015 3	0.135 3	0.227 4
POP6	盘县水塘镇前所村	156 1	5	0.178 6	0.178 6	0.032 6	0.014 6	0.158 0	0.235 7
POP7	盘县刘官镇朱昌河村	147 5	5	0.210 3	0.210 3	0.031 4	0.014 1	0.175 0	0.248 9
POP8	雷山县西江镇干菜村	794	5	0.173 0	0.173 0	0.018 2	0.008 1	0.145 7	0.187 7
POP9	雷山县丹江镇水电村排卡寨	855	5	0.205 5	0.205 5	0.026 2	0.011 7	0.171 9	0.243 8
POP10	水城县阿嘎乡沙坡村排松寨	140 5	5	0.214 6	0.214 6	0.044 8	0.020 0	0.163 0	0.268 5
POP11	水城县阿嘎乡电光村安家寨	143 3	6	0.203 1	0.206 4	0.066 3	0.027 0	0.103 8	0.309 5
POP12	水城县鸡场乡鸡场村	118 5	4	0.147 9	0.147 9	0.016 7	0.008 3	0.130 9	0.169 2
POP13	水城县鸡场乡上营村	157 7	4	0.199 3	0.199 3	0.050 7	0.025 3	0.146 0	0.268 1
POP14	水城县鸡场乡箐头村	153 8	5	0.219 4	0.219 4	0.025 1	0.011 2	0.184 4	0.246 6
POP15	云南腾冲县热海公园	934	5	0.295 0	0.295 0	0.033 3	0.014 9	0.259 1	0.334 1
POP16	云南腾冲县和顺民族村	934	5	0.186 4	0.186 4	0.046 2	0.020 7	0.143 9	0.265 5
POP17	云南保山市隆阳区梨花坞	934	5	0.274 9	0.274 9	0.005 9	0.002 7	0.267 7	0.284 1
POP18	云南保山市高黎贡山	934	5	0.161 1	0.161 1	0.013 6	0.006 1	0.151 4	0.180 3
POP19	兴义市则戎乡拱桥村	115 6	5	0.186 1	0.186 1	0.035 7	0.016 0	0.135 1	0.225 8
POP20	兴义市郑屯乡坡岗村	126 3	3	0.158 2	0.158 2	0.016 0	0.009 2	0.147 5	0.176 6
POP21	兴义市则戎乡花郎村	117 8	4	0.216 2	0.216 1	0.104 2	0.052 1	0.156 7	0.372 0
POP22	兴义市则戎乡冷洞村	122 8	3	0.247 7	0.247 7	0.053 4	0.030 8	0.196 4	0.302 9
POP23	晴隆县沙子镇沙子岭	134 1	5	0.162 8	0.162 8	0.038 4	0.017 2	0.123 9	0.205 8
POP24	晴隆县鸡场镇文丰村	129 6	5	0.191 6	0.191 6	0.030 2	0.013 5	0.145 1	0.221 1
POP25	黔西县重新镇郊外	108 7	5	0.180 9	0.180 9	0.053 1	0.023 8	0.144 2	0.272 6
POP26	黔西县重新镇关门山村	100 8	4	0.170 8	0.170 8	0.038 2	0.019 1	0.127 2	0.203 4
POP27	余庆县白泥镇上里村	680	4	0.281 5	0.281 5	0.147 0	0.073 5	0.181 8	0.499 7
POP28	龙里县湾寨乡新华村	122 5	5	0.207 5	0.207 5	0.048 1	0.021 5	0.156 0	0.265 9
POP29	龙里县湾寨乡对门河村	125 6	4	0.187 5	0.187 5	0.024 9	0.012 5	0.157 5	0.213 7
POP30	龙里县湾寨乡姨妈寨	111 4	5	0.164 5	0.164 5	0.032 6	0.014 6	0.108 7	0.192 7
POP31	施秉县牛场镇栽培基地	932	6	0.231 9	0.231 9	0.056 0	0.022 9	0.168 5	0.288 5
POP32	施秉牛场镇逸样 1	934	5	0.277 0	0.277 0	0.056 7	0.025 4	0.194 8	0.335 9
POP33	施秉牛场镇逸样 2	928	7	0.245 6	0.245 6	0.146 6	0.055 4	0.128 3	0.552 5
POP34	施秉县马号乡冰洞村	492	5	0.254 3	0.254 3	0.060 6	0.027 1	0.187 7	0.327 6
POP35	息烽县温泉镇	683	5	0.241 3	0.241 3	0.034 4	0.015 4	0.194 1	0.282 7
POP36	纳雍县沙包乡小营上村	126 2	3	0.150 0	0.150 0	0.023 4	0.013 5	0.125 0	0.171 5
POP37	纳雍县雍熙镇高坡村	130 8	5	0.232 9	0.232 8	0.021 9	0.009 8	0.201 4	0.262 4
POP38	纳雍县阳长镇癞子岩头	156 9	4	0.298 9	0.298 9	0.061 1	0.030 6	0.218 9	0.367 9
POP39	普安县三板桥镇十里村	172 1	5	0.221 8	0.221 8	0.049 3	0.022 1	0.163 3	0.292 5
POP40	普安县江西坡镇高潮村	135 8	5	0.285 1	0.285 1	0.179 5	0.080 3	0.128 4	0.594 6
POP41	普安县高棉乡干坝村	138 1	6	0.166 9	0.166 9	0.024 3	0.009 9	0.130 6	0.195 9
POP42	毕节市亮岩镇水田坝村	986	4	0.131 3	0.131 3	0.031 7	0.015 9	0.090 3	0.164 6
POP43	毕节市亮岩镇郊	106 6	5	0.146 6	0.146 6	0.038 9	0.017 4	0.087 5	0.192 9
POP44	毕节市亮岩镇关门沟	112 6	5	0.176 0	0.176 0	0.053 9	0.024 1	0.113 3	0.245 3
POP45	凯里市三颗树镇乌利村	695	5	0.271 3	0.271 3	0.044 6	0.019 9	0.234 7	0.339 0
POP46	贵阳花溪区黔陶乡	134 4	6	0.241 2	0.201 0	0.051 0	0.020 8	0.141 7	0.281 7
POP47	贵阳花溪区高坡乡石门村	134 4	3	0.226 1	0.226 1	0.068 9	0.039 8	0.154 6	0.292 0
POP48	台江县老屯乡排略村	730	5	0.330 6	0.330 6	0.067 6	0.030 2	0.227 0	0.394 7
	总数		229		0.209 4	0.070 2	0.004 6	0.087 5	0.594 6

注:因单株样本数较多,表 2 中只列出居群平均数。

通过 SPSS17.0 软件分析没食子酸含量,见表 2。结果显示:48 个样地居群内和居群间没食子酸平均含量差异均较大,达到了极显著水平,标准差的变动范围在 0.005 2 ~ 0.147 0。在居群水平上,平均含量范围为 0.131 3% ~ 0.330 6%,其中以 POP10 (台江老屯乡)居群最高,其次是 POP38 (纳雍阳长镇)0.298 9%、POP15 (云南腾冲)为 0.295 0%,而 POP12 (水城鸡场乡)和 POP42 (毕节亮岩镇)居群含量较低,分别为 0.147 9% 和 0.131 3%。从单株样本来,没食子酸在 0.594 6% ~ 0.147 5%,其中,POP27 (余庆县白泥镇)居群个体之间没食子酸的含量差异较大,盘县范围内的 4 个居群、施秉县范围内的 3 个居群则相对较稳定,标准差变动较小。贵州头花蓼按地理分布区可分为东、西部,东部地区包括了雷山、施秉、余庆、息烽、贵阳、台江、凯里、龙里、息烽、桐梓、惠水县(市),西部地区包括盘县、水城、兴义、晴隆、黔西、纳雍、普安、毕节、赫章县(市)。在地区范围的头花蓼含量比较上,东部地区没食子酸含量要略高于西部地区,见图 2。

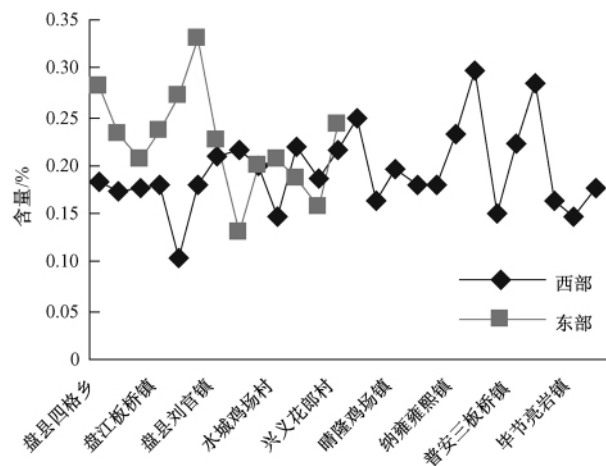


图 2 贵州东部、西部地区居群的没食子酸含量

4 讨论

本文所建立的头花蓼中没食子酸的 HPLC 测定法,准确快速。对头花蓼不同地理种源样品进行没食子酸含量分析发现,没食子酸的含量范围在 0.131 3% ~ 0.330 6%,远高于文献报道,这可能与实验药材的采收期不同所致,本文所有样本均集中于头花蓼药材成熟期的一个月内采样完成,所测定数据在一定程度上反映了药材采收期的真实情况。

各居群间和居群内个体的没食子酸含量差异较大,其中云南腾冲,贵州台江、纳雍、余庆、晴隆和毕节地区的居群间没食子酸含量差异均达到显著水平。

本研究发现,从栽培基地逃逸为野生状态的样本与栽培地样本中没食子酸含量均比较高,表明栽培头花蓼逃逸为野生后,虽脱离了人为管理,但因气候、土壤条件差异不是很大、时间不是很长,种群没有产生明显的遗传变异模式,药用资源类型未变。此外,栽培头花蓼中没食子酸含量的个体差异较小,而野生头花蓼则个体间差异较大,分析认为人工栽培头花蓼的土壤、施肥、生长发育期一致,植株间次生代谢产物的生成与积累也就比较统一和稳定。本文所测定的 48 个居群样本中,近 50% 居群内的个体差异明显。贵州台江老屯乡、纳雍阳长镇、余庆白泥镇、施秉牛大场、施秉牛大场种质圃居群样本没食子酸含量较高,建议进一步结合这些地区的生态信息进行头花蓼种植适生地的研究考察。

[参考文献]

- [1] 白佩瑜. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,1998:57.
- [2] 贵州省中药资源普查办公室. 贵州中药资源 [M]. 北京:中国医药科技出版社,1992:653.
- [3] 包骏,冉懋雄. 贵州苗族医药研究与开发 [M]. 贵阳:贵州科技出版社,1999:147.
- [4] 吴居,王德仁. 石菖蒲化学成分的研究 [J]. 中草药,1985,16(4):5.
- [5] 于明,李占林,李宁,等. 头花蓼的化学成分 [J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(8):11.
- [6] 杨立勇,王祥培,吴梅红,等. HPLC 测定不同产地头花蓼中槲皮苷的含量 [J]. 贵阳中医学院学报,2009,31(7):67.
- [7] 王祥培,万德光,王祥森,等. 不同产地野生与栽培头花蓼中总黄酮的含量分析 [J]. 时珍国医国药,2006,17(9):1713.
- [8] 王祥培,万德光. HPLC 测定不同产地头花蓼中没食子酸的含量 [J]. 华西药理学杂志,2007,22(2):204.
- [9] 王祥培,吴梅红,万德光,等. 不同种源头花蓼中总黄酮及没食子酸的含量比较 [J]. 安徽农业科学,2009,37(4):1606.

[责任编辑 顾雪竹]