

游离型鞣花酸的转化规律及覆盆子含量测定方法的研究

邓雯姬(广州市药品检验所,广东 广州 510160)

摘要:目的 通过探讨鞣花酸酶分解和酸水解的转化机理,优化覆盆子中鞣花酸的测定方法,并考察炮制方式对覆盆子中鞣花酸含量的影响。方法 比较不同提取方式、单宁酶及酸水解对覆盆子中鞣花酸含量的影响,优化鞣花酸含量测定方法,并测定覆盆子炮制品鞣花酸的含量。结果 单宁酶和酸水解能促使缩合型鞣花酸向游离型鞣花酸转化,同时以酸处理建立覆盆子鞣花酸提取方法,优化含量测定方法。覆盆子炮制后鞣花酸含量降低。结论 经酸处理优化的提取含量测定方法,更能全面合理评价覆盆子中鞣花酸的含量。

关键词: 覆盆子; 鞣花酸; 炮制品

中图分类号: R932

文献标志码: A

文章编号: 1674-229X(2023)06-0431-04

Doi: 10.12048/j.issn.1674-229X.2023.06.005

Determine the Content of Ellagic Acid in *Rubus chinensis* Hu Based on the Transformation Mechanism of Ellagic Acid

DENG Wenji(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong 510160, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the determination method of ellagic acid in *Rubus chinensis* Hu by discussing the transformation rule of enzymatic hydrolysis and acid hydrolysis of ellagic acid, and explore the content of ellagic acid in its processed product. **METHODS** The ellagic acid in *Rubus chinensis* Hu extracted by different extraction methods, tannase and acid hydrolysis was determined, compared and optimized. The content of processed products with the optimum method was determined. **RESULTS** Enzymatic hydrolysis and acid hydrolysis promoted the conversion of condensed ellagic acid to free ellagic acid, and the method of acid hydrolysis extraction was established to determine the content. The content of ellagic acid decreased after processing raspberry. **CONCLUSION** The extraction method of acid hydrolysis can comprehensively and reasonably evaluate the content of ellagic acid in raspberry.

KEYWORDS: *Rubus chinensis* Hu; ellagic acid; processed product

覆盆子始载于《神农本草经》,原药材为蔷薇科的华东覆盆子,以其果实入药,是益肾固精常用的中药材^[1-2]。鞣花酸是覆盆子质控指标成分之一,相关文献报道鞣花酸多以缩合形式(如鞣花单宁、苷等)存在^[3-4],加热有利于鞣花酸缩合型向游离型转化^[5]。现行标准测定覆盆子的鞣花酸为游离型。在实际生产应用中,许多企业反映刚采收的覆盆子鞣花酸含量略低于现行标准的规定值,但随着贮存时间的增加,覆盆子中鞣花酸含量得以提高。一般情况下,中药材采收后并非直接用药,企业收购大批药材后也是贮存于仓库待需要发货。基于此种情况,现行标准测定覆盆子中鞣花酸含量的方法有待深入研究。此外,目前关于炮制方法对覆盆子鞣花酸含量影响的研究较少。

本文通过探讨缩合型鞣花酸与游离型鞣花酸的转化机理,优化了覆盆子中鞣花酸的提取方法,并考察炮制方式对鞣花酸含量的影响,为覆盆子的质量评价与炮制应用提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

安捷伦 1260II 高效液相色谱仪; 梅特勒 XS204 千分之一、XP26 万分之一电子天平; Millipore 超纯水仪; 艾尔玛 P300 超声仪; Thermo Fisher 高速离心机; 优莱博恒温水浴锅; 宾德 VD23 恒温恒湿干燥箱。

1.2 试剂

鞣花酸(中检院,批号: 111959-201903, 88.8%); 乙腈为色谱纯级别,购自 MERCK 公司; 水为超纯水;

作者简介: 邓雯姬,主管中药师,研究方向: 药品质量检验及研究, E-mail: 234983626@qq.com

今日药学 2023 年 6 月第 33 卷第 6 期

Pharmacy Today 2023 June, Vol.33 No.6

• 431 •

其它试剂为分析纯级别 购自广州化学试剂公司。

1.3 样品

本实验收集 3 批覆盆子饮片用作研究 ,收集后采用不同的炮制方式制备成实验用样品。

蒸覆盆子制备:取净覆盆子蒸 2 h 至透心后 ,取出 ,室温放凉 ,干燥。盐覆盆子制备^[6]:取净覆盆子 ,盐水闷润 2 h 后 ,蒸至透心后 ,取出 ,室温放凉 ,干燥。(500 g 净覆盆子 ,盐用量为 10 g。)

表 1 覆盆子样品信息

样品编号	产地	炮制方法	样品编号	产地	炮制方法	样品编号	产地	炮制方法
1-1	浙江临安	/	2-1	安徽宣城	/	3-1	江西上饶	/
1-2	浙江临安	蒸制	2-2	安徽宣城	蒸制	3-2	江西上饶	蒸制
1-3	浙江临安	盐制	2-3	安徽宣城	盐制	3-3	江西上饶	盐制

2 方法和结果

2.1 鞣花酸转化机理研究

鞣花酸是一种多酚组分 ,常以缩合型或游离型存在于自然界。基于此 ,本文猜测覆盆子中的鞣花酸存在缩合和游离两种形式 ,且通过恰当的方式可以使缩合型向游离型转变。制备鞣花酸常用的方法为酸水解(稀硫酸、稀盐酸)^[7]、生物酶转化(单宁酶、鞣花单宁酶)^[8]、直接提取(甲醇、丙酮作萃取剂)^[9]等。本文猜想酶解和酸水解可以促使覆盆子中鞣花酸缩合型向游离型转化:酶解是覆盆子中存在一种内源酶 ,促使缩合型的鞣花酸转化为游离型 ,酸水解是通过加酸水解 ,促使缩合型的鞣花酸转化为游离型。为进一步验证上述猜测 ,本文分别设计单宁酶和盐酸对覆盆子鞣花酸含量影响的实验 ,探讨鞣花酸缩合型向游离型的转化机理。

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈(5 μm , 200 nm×4.6 mm);流动相: A 乙腈-B 0.2%磷酸溶液 ,采用梯度方式洗脱 ,时间 0~40 min ,乙腈 8%~20%;DAD 检测器 ,波长 254 nm;柱温为 30 ℃;流速:1.0 mL·min⁻¹;进样体积为 10 μL。

2.1.2 酶解方式的考察 单宁酶又称鞣花酸酶 ,相关研究表明其能催化缩合型鞣花酸向游离型鞣花酸转化^[8]。本文猜想覆盆子自身存在一种酶 ,促使鞣花酸缩合型向游离型的转化。基于此本文设计以下实验进行验证:用纯化水稀释单宁酶浓度至 50 U·mL⁻¹ ,精密称取覆盆子粉末(过四号筛) 5 g ,均匀喷洒单宁酶溶液 ,使粉末湿润 ,放置 37 ℃恒温箱 1 d 后待用。同法另取一份覆盆子用纯化水喷洒作空白对照组。分别精密称取上述粉末 0.5 g 置回流瓶 ,量取 70%甲醇 50 mL 于回流瓶 ,称重 ,90 ℃恒温回流 2 h ,称重 ,用提取溶剂补足失重 ,混匀 ,离心。量取上清液 1 mL 用 70%甲醇稀释 5 倍 ,取续滤液 ,进样测定。

结果显示:喷洒单宁酶的粉末中鞣花酸的含量(0.92%) 明显高于喷洒纯化水的粉末(0.29%)。表明本文猜测正确 ,覆盆子自身可能存在着一种类似单宁酶的酶 ,催化体内鞣花酸缩合型向游离型转化。

2.1.3 酸水解转化规律的考察 考察盐酸浓度和水解时间 2 个因素 ,实验操作如下:取本品粉末(过四号筛) 0.5 g ,置回流瓶中 ,精密加入含不同浓度盐酸(0.0%、2.2%、4.4%、8.7%) 的 70%甲醇 50 mL ,称重 ,按表 2 提取方法(提取时间 1、2、3 h) ,置冰浴上迅速冷却 ,再称重 ,用含不同浓度盐酸的 70%甲醇补足失重 ,混匀 ,离心。量取上清液 1 mL ,量取上清液 1 mL 用相应提取溶剂稀释 5 倍 ,取续滤液 ,进样测定 ,结果见表 2。

表 2 盐酸浓度和提取方法对鞣花酸含量的影响(n=2)

盐酸浓度 , 提取方法	鞣花酸 含量 / %	盐酸浓度 , 提取方法	鞣花酸 含量 / %
0.0% 超声提取 ,1 h	0.25	8.7% 加热回流 ,1 h	1.48
0.0% 加热回流 ,1 h	0.28	4.4% 加热回流 ,2 h	1.01
0.0% 加热回流 ,2 h	0.30	8.7% 加热回流 ,2 h	2.08
2.2% 加热回流 ,2 h	0.64	8.7% 加热回流 ,3 h	2.18

结果显示 ,覆盆子中鞣花酸的含量与提取溶剂中盐酸浓度呈正相关;且鞣花酸的含量随着加热回流时间增加而增加 ,但同等盐酸条件下回流 3 h 鞣花酸含量趋于稳定增加幅度不大(<5%) ,表明此时覆盆子中缩合型的鞣花酸已基本完全转化为游离型的鞣花酸。

2.1.4 小结 覆盆子在贮存过程中 ,自身存在内源酶不断催化缩合型鞣花酸转化成游离型鞣花酸。这合理解释了覆盆子贮存时间越长久鞣花酸含量越高的现象。所以有必要建立一种更科学合理的鞣花酸含量测定方法。

2.2 酸水解测定游离型鞣花酸的含量

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈(5 μm ,200 $\text{nm}\times 4.6\text{ mm}$); 流动相: 乙腈(A) -0.2%磷酸溶液(B) ,采用梯度方式洗脱 ,时间 0~40 min ,乙腈 8%~20%; DAD 检测器 ,波长 254 nm ; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积: 对照品 10 μL 、供试品视实际情况 5~10 μL 。

2.2.2 溶液的制备

2.2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定鞣花酸对照品适量置量瓶 ,温水浴使其溶解 ,室温放凉后加 70%甲醇定容至刻度 ,得 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照溶液。

2.2.2.2 供试品溶液的制备 根据酸水解转化规律考察的结果 ,结合 2020 年版中国药典覆盆子中鞣花酸含量测定现行标准 ,确定供试品制备方法如下^[1]: 取覆盆子粉末(过四号筛) 0.5 g 置回流瓶中 ,精密量取含 8.7%盐酸的 70%甲醇 50 mL 于回流瓶 ,称重 ,90 $^{\circ}\text{C}$ 恒温回流 2 h ,置冰浴迅速冷却 ,再称重 ,用含 8.7 %盐酸的 70%甲醇补足失重 ,混匀 ,离心。精密量取上清液 1 mL 用提取溶剂稀释 5 倍 ,取续滤液 ,进样测定。

2.2.3 专属性考察

分别取鞣花酸对照和供试品溶液 ,按“2.2.1”项下色谱条件下进行测试 ,两者 HPLC 色谱图中呈现保留时间一致的色谱峰 ,见图 1。

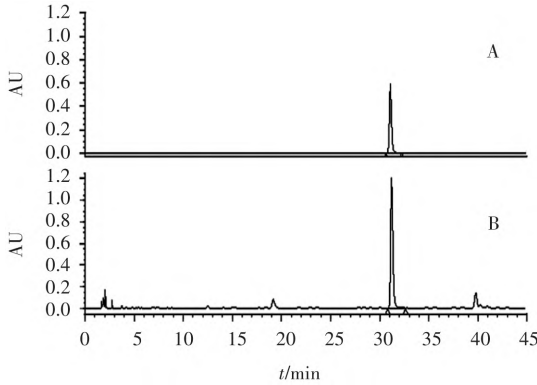


图 1 对照品(A)和供试品溶液(B) HPLC 色谱图

2.2.4 精密度试验 吸取对照品溶液依法进样测定 ,进样体积为 10 μL ,进样次数为 6 ,结果显示 ,鞣花酸峰面积的 RSD 为 0.1% ,表明仪器精密性符合分析测试规范。

2.2.5 线性关系 分别配制浓度为 2、5、10、20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞣花酸对照品溶液 ,依法进样测定 ,进样体积均为 10 μL 。以峰面积 A 为纵坐标(Y) ,鞣花

酸进样量为横坐标(X) ,计算得鞣花酸回归方程: $Y=53\ 050X+33\ 876$, $r=0.999$,其线性范围为 0.020 6~0.825 5 μg 。

2.2.6 稳定性考察 取同一供试品溶液 ,制备后在放置 0、2、4、6、12、24 h 依法取样 ,测定鞣花酸峰面积 ,计算得其 RSD 为 0.4% ,表明供试品溶液室温条件下 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性考察 取同一批覆盆子药材 6 份 ,以优化后的提取方法制备供试品溶液测定。结果显示 ,该批次覆盆子的鞣花酸平均含量为 2.35% , RSD 为 1.0%。

2.2.8 加样回收率考察 取已知含量的覆盆子约 0.25 g ,置于 50 mL 的容量瓶中 ,平行 6 份 ,加入含鞣花酸的提取溶剂 ,加入对照品的量约为该批次覆盆子鞣花酸含量的 50% ,以优化后的提取方法制备供试品进样 ,计算 ,得鞣花酸的平均回收率为 103.45% , RSD 为 1.2%。

2.2.9 样品的测定 以优化后的方法测定覆盆子样品鞣花酸的含量 ,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果表($n=2$)

样品 编号	鞣花酸 含量 / %	样品 编号	鞣花酸 含量 / %	样品 编号	鞣花酸 含量 / %
1-1	2.31	2-1	2.02	3-1	2.01
1-2	2.08	2-2	1.76	3-2	1.80
1-3	2.01	2-3	1.63	3-3	1.78

3 讨论

3.1 提取方法的优化

现行标准提取覆盆子鞣花酸含量的方法为加热回流 ,本文比较了超声提取和加热回流两种方法 ,结果显示加热回流提取鞣花酸的含量较高 ,推测一方面鞣花酸在覆盆子中以缩合型存在 ,受热促使其向游离型鞣花酸转化 ,另一方面温度升高加剧分子热运动有助于鞣花酸从细胞扩散溶解至提取溶剂中 ,因为加热回流温度比超声提取温度高 ,所以水解成游离型鞣花酸较多 ,因此采用加热回流方法。再者 ,本文发现鞣花酸的含量与提取时间呈正相关 ,加热时间的长短会影响鞣花酸含量的准确性。此外 ,酶解方式实验结果显示酶解方式处理覆盆子的鞣花酸含量明显高于空白对照组 ,表明覆盆子自身可能存在着一种类似单宁酶的酶 ,不断催化体内缩合型鞣花酸(多以鞣花单宁 ,鞣花苷形式存在) 向游离型(鞣花酸) 转化。现行标准测定覆盆子的有效成分

为游离型鞣花酸,其分子量小更易被人体吸收,具有抗癌抗菌、抗炎等药理作用^[10]。结合实际情况,药材采收一般贮存待用,而覆盆子鞣花酸的含量在酶催化作用下随着贮存时间的增加而增加。因此本文认为,现行标准测定覆盆子鞣花酸的含量仅为部分游离型鞣花酸,该方法未能真实准确反映覆盆子中鞣花酸的含量,更多的游离型鞣花酸待缩合型鞣花酸向其转化,有必要建立新的提取方法。有文献报道酸可以使缩合型鞣花酸和鞣花酸苷水解为单体,从而提高了鞣花酸转化率^[11]。虽然覆盆子中游离型鞣花酸在酶的作用下转化,但基于实际操作,酶处理样品不可控因素较多,使用酸水解具可行性。因此,本文开展了酸水解测定覆盆子中鞣花酸含量的实验,结果显示覆盆子中鞣花酸含量随着提取溶剂含盐酸浓度的增加而增加,固选取含 8.7% 盐酸的 70% 甲醇溶液为提取溶液;对比同等浓度盐酸条件下回流 2 h 和 3 h,游离鞣花酸增加少于 5%,考虑时间效率因素,选取加热回流时间为 2 h。综上所述,覆盆子鞣花酸含量测定优化后的提取方法为加热回流,提取溶剂为含 8.7% 盐酸的 70% 甲醇 50 mL,回流时间为 2 h。

此外现行标准记载覆盆子鞣花酸含量提取后采用过滤方法,取续滤液进一步稀释。在本研究中对过滤和离心方法后样品中鞣花酸含量并无显著性差异,但过滤用时较长,为了提高效率,故本研究采用离心方法。

3.2 炮制品对覆盆子鞣花酸的影响

炮制具有增效扩效的作用,是中医用药的特色。覆盆子具益肾固精缩尿之功,临床上早期应用为蒸制品,后期依据盐入肾经引进了盐制品^[12]。本实验测得覆盆子炮制后鞣花酸含量反而降低,具体如下:生品>蒸制品>盐制品。分析其原因可能是一方面在炮制过程中蒸煮加热温度较高抑制了内源酶的活性,进而抑制了缩合型鞣花酸向游离型鞣花酸的转化;另一方面相关文献曾报道温度上升超过 95℃,鞣花酸因被氧化破坏或分子结构改变,其得率反而下降^[13]。在蒸煮过程中,温度高达 100℃,因此蒸制品鞣花酸含量有所下降。比较两者炮制品,盐制品鞣花酸含量较蒸制品的低,可能是游离型鞣花酸在闷润过程中溶于盐水所导致。虽然炮制后覆盆子

中的鞣花酸含量降低了,但中医理论讲究的是整体效应,不能因为单个成分含量降低否定了炮制作用,覆盆子药理药效成分及机制也有待进一步探究。

3.3 色谱条件的优化

2020 年版中国药典 1 部采用乙腈-0.2% 磷酸 (15:85) 等度洗脱测定鞣花酸的含量,但该色谱系统条件下鞣花酸峰形较差,而本文采用梯度洗脱,鞣花酸峰形得到改善,理论塔板数有所提高,且无杂峰干扰。

覆盆子市场需求量大,临床应用广泛。其质控成分鞣花酸受提取方法、炮制方法、贮存时间影响较大,现行质量控制标准未能准确测定覆盆子中鞣花酸的含量。本文优化了覆盆子中提取鞣花酸的方法,并初步探讨了炮制对鞣花酸影响,为覆盆子的质量评价和炮制应用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020:399-400.
- [2] 程丹,李洁,周斌,等.覆盆子化学成分及药理作用的研究进展[J].中药材,2012,35(11):1873-1876.
- [3] 郭增军,谭林,徐颖,等.鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性[J].天然产物研究与开发,2010,22(3):519-540.
- [4] 王妙飞,程庚金生,张道英,等.水解法制取五倍子鞣花酸的研究[J].食品工业科技,2010,31(2):233-234.
- [5] 梁献葵,王艳慧,雷敬卫,等.不同产地加工炮制方法对栀子质量的影响[J].中国中药杂志,2018,43(16):3285-3290.
- [6] 重庆市卫生厅.重庆市中药饮片炮制规范及标准[M].重庆:重庆市卫生厅,2006:101.
- [7] Di Y J, Jia G F. Study on the ultrasonic extraction process of ellagic acid from pomegranate husk [J]. Prog Mod Biomed, 2010, 10: 3703-3705.
- [8] 屈艳君,王文慧,曹家南,等.鞣花酸的制备及应用研究进展[J].中国食物与营养,2022,28(6):39-45.
- [9] 李小萍,梁琪,辛秀兰,等.红树莓果中鞣花酸提取物的抗氧化性研究[J].食品科技,2010,35(5):182-185.
- [10] 范高福,胥振国,刘修树,等.植物提取物鞣花酸的药理作用及制剂研究进展[J].基因组学与应用生物学,2016,35(12):3562-3568.
- [11] 杨笑笑,邢晓平,纪白慧.水解法制备石榴皮鞣花酸工艺研究[J].现代生物医学进展,2006,6(5):11-13.
- [12] 张希,廖宇娇,杨卓,等.覆盆子盐制前后化学成分及药效学变化研究[J].食品工业科技,2013,34(12):284-288.
- [13] 刘卉,杨国伟,兰蓉,等.树莓叶中鞣花酸提取工艺的研究[J].食品研究与开发,2015,36(18):55-288.

(收稿日期:2023-02-27;在线出版日期:2023-06-01)