



RP-HPLC 同时测定石榴皮提取物中的3种鞣质成分

刘振平, 陈祥贵*, 杨潇, 何宇新, 杨文字, 彭海燕, 李玉锋
(西华大学 生物工程学院 食品生物技术四川省高校重点实验室, 四川 成都 610039)

摘要 目的: 建立同时检测石榴皮提取物中安石榴苷、鞣花酸和石榴皮鞣素的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Arcus EP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1% TFA 为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。结果: 安石榴苷、鞣花酸和石榴皮鞣素分别在 0.034~0.408, 0.004~0.048, 0.032~0.384 μg 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 98.20%, 100.02%, 96.10%。结论: 该方法精密可靠, 可作为同时检测石榴皮提取物中安石榴苷、鞣花酸和石榴皮鞣素 3 种有效成分的方法。

关键词 石榴皮提取物; 安石榴苷; 鞣花酸; 石榴皮鞣素; RP-HPLC

石榴 *Punica granatum* L. 在我国多个地区广泛种植, 是一种药食两用的植物资源。石榴各部位含有多功能性成分, 具有广泛的药理活性。石榴皮为传统中药, 主要用于久泻、出血、蛔虫等证。石榴皮鞣质成分是影响石榴皮及其提取物质量的主要因素, 国内外大量的研究表明石榴皮鞣质在预防和治疗心脑血管疾病、肿瘤、糖尿病等方面具有显著效果^[1]。因此《中国药典》规定石榴皮中鞣质不得低于 10%。但是目前大多数研究和实践中主要测定总鞣质, 少有对特异性和特征性成分进行测定, 尚未见到同时测定多种石榴皮鞣质成分的报道。本文采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC), 建立同时检测石榴皮提取物中 3 种主要的鞣质类成分安石榴苷(punicalagin)、鞣花酸(ellagic acid)、石榴皮鞣素(punicalin)的方法。

1 材料

日本岛津 HPLC 系统 LC-20AB, SPD-M20A 紫外检测器; VARIAN Cary300 uv-vis 分光光度计; Milli-Q Biocel 超纯水系统; 超声波清洗器; 1/1 万电子天平。甲醇(色谱纯); 其他试剂均为分析纯; 石榴皮药材购于成都荷花池中药专业市场并由西华大学

天然产物研究所中药学杨文字博士鉴定; 安石榴苷、石榴皮鞣素对照品(纯度≥98%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 鞣花酸对照品(纯度≥98%)购自山东中药化学对照品工程技术研究中心; 所用水均为 Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Arcus EP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-TFA(0.1%), 梯度洗脱条件: 0~5 min, TFA(0.1%) 92%~70%; 5~11 min, TFA(0.1%) 70%; 11~11.5 min, TFA(0.1%) 70%~55%; 11.5~30 min, TFA(0.1%) 55%; 柱温 35℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 检测波长 254 nm。在此色谱条件下, 安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素能很好的分开, 分离度均大于 1.5。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素对照品适量溶于甲醇, 分别制成 340, 40, 320 mg·L⁻¹ 的溶液, 分别取上述对照品溶液各 100 μL 混合并稀释至 1 mL 作为对照品溶液, 其中安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素的质量浓度分别为 34, 4, 32 mg·L⁻¹ 备用。

2.3 样品溶液的制备

参考文献[2]的方法: 40%乙醇作溶剂, 料液比(g:mL) 1:35, 微波功率为 242 W, 提取时间 60 s, 提取 3 次, 提取石榴皮中的多酚物质, 冻干, 备用。取石榴皮的多酚提取物冻干粉 1.00 g 超声 30 min 溶

稿件编号 20110613004

基金项目 国家星火计划项目(2010GA810002); 四川省科技攻关项目(05SG011-021)

通信作者 * 陈祥贵, E-mail: chenxianggui@tom.com

作者简介 刘振平, 硕士研究生, 主要从事天然产物与营养保健方面的研究与开发, E-mail: nping305@126.com

于甲醇,完全溶解后定容至 100 mL,10 000 r · min⁻¹离心 3 min 后取上清液,稀释制备成含提取物为 1 000 mg · L⁻¹的样品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取 2.2 项下制备的对照品溶液分别进样 1,2,4,6,8,12 μL,相当于进样安石榴苷 0.034,0.068,0.136,0.204,0.272,0.408 μg; 鞣花酸 0.004,0.008,0.016,0.024,0.032,0.048 μg; 石榴皮鞣素 0.032,0.064,0.128,0.192,0.256,0.384 μg。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得线性回归方程分别为:安石榴苷 $Y = 3\,131.022X - 14\,472.86$, $r = 0.999\,9$ 和 $Y = 3\,142.563X - 20\,444.94$, $r = 0.999\,9$; 鞣花酸 $Y = 8\,841.782X + 12\,574.42$, $r = 0.999\,7$; 石榴皮鞣素 $Y = 3\,419.578X - 25\,756.26$, $r = 0.999\,7$ 。安石榴苷、鞣花酸和石榴皮鞣素进样量分别在 0.034 ~ 0.408,0.004 ~ 0.048,0.032 ~ 0.384 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.2 精密度试验 连续进样样品溶液 5 次,每次进样量为 10 μL,得安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素的峰面积的 RSD 2.1%,0.99%,1.1%,说明仪器精密密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取样品溶液按上述色谱条件分别在 0,3,6,9,16 h 进样,进样量为 10 μL,计算得安石榴苷,鞣花酸,石榴皮鞣素的峰面积的 RSD 2.8%,1.1%,1.9%,说明样品在 16 h 内稳定。

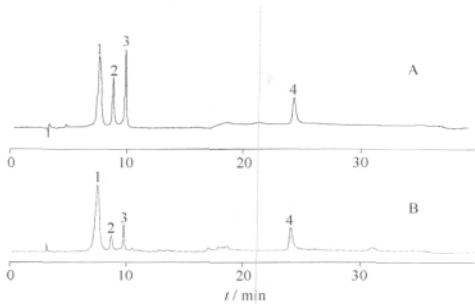
2.4.4 重复性试验 取石榴皮 5 份按 2.3 项下方法平行制取样品溶液并测定,安石榴苷,鞣花酸,石榴皮鞣素峰面积的 RSD 2.0%,0.60%,1.7%,重复性良好。

2.4.5 回收率试验 取已知含量(安石榴苷 51.40 mg · g⁻¹,鞣花酸 17.11 mg · g⁻¹,石榴皮鞣素 180.40 mg · g⁻¹)的供试品 6 份,分别加入适量 3 种对照品溶液。按照样品测定项下方法测定,计算回收率分别为 98.20%,100.02%,96.10%,RSD 2.4%,2.1%,2.9%,见表 1。

2.4.6 样品含量测定 按 2.3 项下方法制备 5 批样品溶液,分别精密吸取样品溶液 100 μL 并稀释至 1 mL,摇匀,在已选定的色谱条件下进样 20 μL,按外标法定量,色谱图如对照品和样品液相色谱图见图 1。结果表明,样品中安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素能很好的分离,分离度均大于 1.5,分别计算各成分含量,见表 2。

表 1 安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素回收率试验

成分	样品量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
安石榴苷	0.49	25.17	25.50	50.30	98.55	2.4
	0.51	26.21	25.50	50.37	94.75	
	0.49	25.17	25.50	50.90	100.90	
	0.50	25.70	25.50	50.44	97.00	
	0.49	25.17	25.50	50.82	100.59	
鞣花酸	0.50	25.70	25.50	50.54	97.39	2.1
	0.49	8.38	8.00	16.60	102.75	
	0.51	8.73	8.00	16.65	99.00	
	0.49	8.38	8.00	16.30	98.94	
	0.50	8.56	8.00	16.77	102.56	
石榴皮鞣素	0.49	8.38	8.00	16.32	99.25	2.9
	0.50	8.56	8.00	16.37	97.63	
	0.49	88.40	84.00	166.62	93.12	
	0.51	92.00	84.00	175.90	99.88	
	0.49	88.40	84.00	168.04	94.81	
	0.50	90.20	84.00	172.16	97.57	
	0.49	88.40	84.00	166.73	93.25	
	0.50	90.20	84.00	172.51	97.99	



1. 石榴皮鞣素;2,3. 安石榴苷;4. 鞣花酸。

图 1 对照品(A)和样品(B)液相色谱图

表 2 石榴皮提取物中的 3 种鞣质成分测定

样品批次	安石榴苷	鞣花酸	石榴皮鞣素
1	57.69	13.66	166.32
2	54.3	13.02	168.86
3	60.56	14.55	170.92
4	58.21	14.24	159.08
5	61	15.01	175.72

3 讨论

鞣质成分是石榴皮药理活性的重要物质基础,一般认为以鞣花酸为代表。因此,相对于其他鞣质成分,鞣花酸的药理学、提取和检测方法的研究报道要多得多。已有多篇文献报道了检测石榴皮中鞣花酸的高效液相色谱法和高效毛细管电泳法^[3-4]。



Jimenez 等^[8]通过研究认为以安石榴苷是石榴皮鞣质类成分的主体,其含量远高于鞣花酸和石榴皮鞣素,因此认为应该用安石榴苷和鞣花酸的含量来评价石榴提取物的质量。但是,由于不同地域、不同品种等因素的影响,石榴皮的鞣质成分的含量可能具有较大的变化。参考文献[6-8]提取石榴皮中多酚物质提取方法分别制备石榴皮提取物,经检测表明宋薇薇等^[9]建立的石榴皮中多酚物质提取方法所得提取物中鞣花酸、安石榴苷和石榴皮鞣素含量最高,故采用此方法获得石榴皮提取物。结果表明,石榴皮鞣素在石榴皮提取物中含量较高,安石榴苷次之,鞣花酸含量最低。

流动相的选择是建立同时检测多种成分的 HPLC 方法的关键。在待测的 3 种成分中,安石榴苷和石榴皮鞣素具有非常相似的性质,而安石榴苷是由 1 对同分异构体组成,这些特点都给本检测方法的建立带来了挑战。参考李海霞等对石榴皮提取物中安石榴苷的检测方法^[9],用甲醇-醋酸(2%)作为流动相,采取梯度洗脱可以将安石榴苷的 2 个同分异构体合并成 1 个峰,同时也能很好的将鞣花酸分开,但不能将石榴皮鞣素和安石榴苷分开。采用 Zhou 等^[10]报道的关于对石榴皮中石榴皮鞣素的分离与纯化以及 Lu 等^[11]报道的对石榴皮中安石榴苷的分离与纯化方法中流动相甲醇-三氟乙酸(TFA)(0.1%),通过优化调整,建立了能将 3 种待检测成分分离的色谱条件,样品中石榴皮鞣素特征峰的理论塔板数为 1 800,为得到更佳的色谱条件以改进石榴皮鞣素特征峰峰型,但经过反复调整未能得到比对照品和样品液相色谱图 B 更好的色谱图。

在本文建立的检测方法中,安石榴苷的一对同分异构体(α,β)呈现双峰。反相 HPLC 在判断此类异构体方面有独到之处,正相 HPLC 区别不开 α,β 异构体。采用硼氢化钠还原的方法可将双峰变换为 1 个新的单峰进行检测,这对于定量来说更加简便。但对于要同时检测多种成分,硼氢化钠的加入可能会影响其他待检测成分。而且,保留安石榴苷同分

异构体的双峰形式有利于对 2 种异构体分别进行定量。但是,由于目前可提供的安石榴苷对照品均为 2 个同分异构体的混合物,而对照品中和样品中 2 个同分异构体的比例也往往不一致,故不能用单个峰绘制标准曲线。岛津 LC20AB 系统不能将安石榴苷 2 个峰的峰面积之和作为纵坐标来绘制 1 条标准曲线,故本文中将安石榴苷的 2 个同分异构体绘制成 2 条标准曲线,然后按 2 个峰的峰面积之比将所进样中安石榴苷的量分成 2 份分别做标准曲线,最后标准曲线较精确符合试验要求。

参考文献

- [1] Jurenka J S. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review [J]. Altern Med Rev, 2008, 13(2): 128.
- [2] 宋薇薇,焦士蓉,周佳,等. 石榴皮多酚的微波辅助提取及提取物抗氧化与抑菌作用研究 [J]. 现代食品科技, 2008, 24(1): 23.
- [3] 周本宏,吴振华,刘春,等. 高效液相色谱法测定石榴皮中鞣花酸的含量 [J]. 广东药学院学报, 2005, 21(6): 693.
- [4] 周本宏,吴振华,李小军,等. 高效毛细管电泳法测定石榴皮中鞣花酸的含量 [J]. 中国药房, 2005, 16(24): 1893.
- [5] Jimenez Del Rio M, Ramazanov A, Sikorski S, et al. A new method of standartization of health-promoting pomegranate fruit (*Punica granatum*) extract [J]. J Georgian Med News, 2006, 140: 70.
- [6] 孙兰萍,张斌,赵大庆,等. 石榴皮中多酚的醇提取工艺优化 [J]. 包装与食品机械, 2007, 25(4): 20.
- [7] 赵艳红,李建科. 响应曲面法建立超声波辅助提取石榴皮多酚数学模型 [J]. 农产品加工学刊, 2009, 3: 126.
- [8] 朱静,陆晶晶,袁其朋. 大孔吸附树脂对石榴皮多酚的分离纯化 [J]. 食品科技, 2010, 35(1): 188.
- [9] 李海霞,张红玲,刘延泽,等. RP-HPLC 法测定石榴皮中安石榴苷 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 780.
- [10] Zhou Honghao, Lv Jiao, Yuan Qipeng. Preparative isolation and purification of punicalin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography [J]. Sep Puri Technol, 2010, 72: 225.
- [11] Lu Jingjing, Wei Yun, Yuan Qipeng. Preparative separation of punicalagin from pomegranate husk by high-speed counter current chromatography [J]. J Chromator B, 2007, 857: 175.

责任编辑 吕冬梅