

RP-HPLC法同时测定石榴皮中4种多酚类成分的含量^Δ

刘振平^{1,2*}, 陈祥贵^{1#}, 彭海燕¹, 杨文字¹, 杨 潇¹, 何宇新¹, 李玉锋¹(1.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, 成都 610039; 2.重庆安全技术职业学院, 重庆 404000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0238-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.16

摘要 目的:建立同时检测石榴皮中没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Arcus EP-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%三氟乙酸(梯度洗脱), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为254 nm(没食子酸)、377 nm(石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸)。结果:没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸的进样量分别在0.020~0.320、0.038~0.608、0.074~1.184、0.039~0.624 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 分别为0.999 7、0.997 1、0.997 8、0.999 4);平均加样回收率分别为93.22%、95.35%、98.00%、99.84%, RSD分别为2.75%、2.28%、2.11%、1.82%(n 均为6)。结论:本方法精密、可靠,可作为检测石榴皮中没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸4种有效成分的方法。

关键词 石榴皮; 没食子酸; 石榴皮鞣素; 安石榴苷; 鞣花酸; 反相高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of 4 Polyphenols in *Punica granatum* by RP-HPLC

LIU Zhen-ping^{1,2}, CHEN Xiang-gui¹, PENG Hai-yan¹, YANG Wen-yu¹, YANG Xiao¹, HE Yu-xin¹, LI Yu-feng¹(1. Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan Provincial University, School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. Chongqing Vocational Institute of Safety & Technology, Chongqing 40400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of gallic acid, punicalin, punicalagin and ellagic acid in *Punica granatum*. METHODS: RP-HPLC method was used. The determination was carried out on Arcus EP-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of methanol-0.1% TFA (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength of gallic acid was at 254 nm, and that of punicalin, punicalagin and ellagic acid were at 377 nm. RESULTS: The linear range was 0.020-0.320 μg for gallic acid ($r=0.999$ 7), 0.038-0.608 μg for punicalin($r=0.997$ 1), 0.074-1.184 μg for punicalagin ($r=0.997$ 8), 0.039-0.624 μg for ellagic acid ($r=0.999$ 4). The average recoveries were 93.22% (RSD=2.75%, $n=6$), 95.35% (RSD=2.28%, $n=6$), 98.00% (RSD=2.11%, $n=6$) and 99.84% (RSD=1.82%, $n=6$), respectively. CONCLUSION: The method is accurate, reliable and suitable for the content determination of gallic acid, punicalin, punicalagin and ellagic acid in *P. granatum*.

KEY WORDS *Punica granatum*; Gallic acid; Punicalin; Punicalagin; Ellagic acid; RP-HPLC; Content determination

版.北京:中国医药科技出版社,2010:97、附录34.

- [2] 蒋渝,武小赞,王欣,等.川白芷有机氯类农药残留量的检测[J].中国药房,2012,23(19):1 808.
- [3] 吴媛媛,蒋桂华,马逾英,等.白芷的药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2009,20(3):625.
- [4] 张静,邓瑞,范刚,等.基于化学计量学的RRLC指纹图谱在川白芷硫熏前后质量控制和识别中的应用[J].中国药理学杂志,2011,46(6):418.
- [5] Fan G, Deng R, Zhou L, *et al.* Development of a rapid resolution liquid chromatographic method combined with chemometrics for quality control of Angelicae Dahuricae radix[J]. *Phytochem Anal*, 2012,23(4):299.

^Δ 基金项目:国家科技部星火计划重点项目资助(No.2010GA810002);四川省科技攻关项目资助(No.05SG011-021)

* 硕士研究生。研究方向:天然产物与营养保健品的研发。E-mail:nping305@126.com

通信作者:教授,硕士研究生导师,博士后。研究方向:天然产物与营养保健品的研发。E-mail:chenxianggui@tom.com

- [6] 张玉方,余红梅.硫熏对白芷香豆素类成分含量的影响研究[J].中国中药杂志,1997,22(9):536.
- [7] 马逾英,高颖,邹文莉,等.熏硫川白芷药材对小鼠镇痛作用的影响[J].华西药学杂志,2006,21(6):616.
- [8] 杨智海,宋莉,乔蓉霞,等.中药外源性有害残留物二氧化硫的研究进展[J].药物分析杂志,2010,30(11):2 246.
- [9] 杨芳,万丽,胡一晨,等.一测多评法测定川白芷药材中3种香豆素类成分的含量[J].中国中药杂志,2012,37(7):956.
- [10] Zheng XG, Zhang XW, Sheng XN, *et al.* Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in Radix Angelicae Dahuricae by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010,51(3):599.
- [11] 邓瑞,张静,罗维早,等.RRLC-UV同时测定川白芷中6种香豆素类成分的含量[J].中国中药杂志,2010,35(23):3 184.

(收稿日期:2012-05-15 修回日期:2012-10-15)

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。其各部位含有多种功能性成分,具有广泛的药理活性。其中,石榴皮为传统中药,主要用于治疗久泻、出血、蛔虫等证。石榴皮多酚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多酚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》规定石榴皮中含多酚不得低于10%。但是,目前大多数研究主要测定石榴皮中总多酚含量,少有对其特异性或特征性成分进行测定的报道。因此,笔者采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,建立了同时检测石榴皮中4种主要的多酚类成分——没食子酸(Gallic acid)、石榴皮鞣素(Punicalin)、安石榴苷(Punicalagin)和鞣花酸(Ellagic acid)含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AB HPLC 系统、SPD-M20A 紫外检测器(日本岛津公司);KQ-100DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:40 kHz,功率:100 W);Milli-Q Biocel 超纯水系统(美国 Millipore 公司);TB-214 万分之一电子天平(美国 Denver instrument 公司);RE-52B 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂

甲醇为色谱纯,水为 Milli-Q 超纯水,其他试剂均为分析纯;没食子酸对照品(四川省食品药品检验所,纯度 $\geq 98\%$,批号:110831-200803);石榴皮鞣素(纯度 $\geq 98\%$,批号: MUST-09101807)、安石榴苷(纯度 $\geq 98\%$,批号: MUST-09112806)对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司;鞣花酸对照品(山东中药化学标准品工程技术研究中心,纯度 $\geq 98\%$)。

1.3 药材

石榴皮购自成都荷花池中药专业市场,由西华大学天然产物研究所杨文宇副教授鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Arcus EP-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇(A)-0.1% 三氟乙酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 98% → 87% B; 10~20 min, 87% B; 20~20.5 min, 87% → 60% B; 20.5~42 min, 60% B);柱温: 35 °C;流速: 1.0 ml/min;进样量: 10 μl;没食子酸的检测波长: 254 nm,石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸的检测波长: 377 nm。在此色谱条件下,没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸能很好的分离,分离度均 >1.5 。色谱见图1。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸对照品适量,以甲醇溶解并制成浓度依次为 400、380、370、390 μg/ml 的对照品贮备液。依次精密吸取上述 4 种对照品贮备液 50、100、200、100 μl 混合并稀释至 1 ml,作为对照品溶液,其中没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸的质量浓度分别为 20、38、74、39 μg/ml。

2.3 供试品溶液的制备

参考文献^[2]方法:取石榴皮粉末 1 g,依次加入等体积的甲醇、乙醇、丙酮和水共 100 ml,超声提取 30 min,滤过,得提取液。共制备 2 份,其中一份以 10 000 r/min 离心 3 min,取上清液,于 377 nm 波长下测定石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸;另

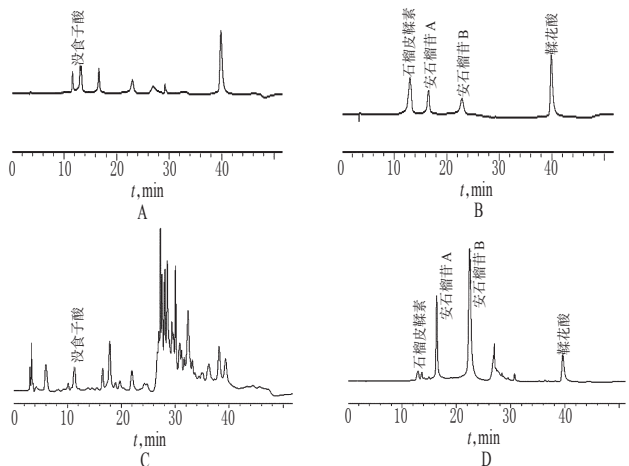


图1 高效液相色谱图

A. 没食子酸对照品;B. 石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸混合对照品; C. 供试品(254 nm);D. 供试品(377 nm)

Fig 1 HPLC chromatograms

A. gallic acid control; B. mixture of punicalin, punicalagin and ellagic acid; C. test samples (254 nm); D. test samples (377 nm)

一份以 10 000 r/min 离心 3 min 后取上清液,再用同样的溶剂重复洗涤沉淀 2 次并收集上清液,合并上清液,在旋转蒸发器中于 35 °C 蒸干有机溶剂,用 25 ml 醋酸乙酯萃取,重复 2 次,收集并合并有机相,低压旋转蒸干,取蒸干后的固体溶于 100 ml 甲醇中,于 254 nm 波长下测定没食子酸。

2.4 线性关系考察

取各对照品溶液分别进样 1、2、4、6、8、10、12、16 μl,按上述色谱条件测定。以进样量(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程分别为没食子酸: $y=2\ 353.15x-17\ 496$ ($r=0.999\ 7, n=8$);石榴皮鞣素: $y=880.44x-23\ 405.09$ ($r=0.997\ 1, n=8$);安石榴苷 A: $y=403.18x-11\ 971.98$ ($r=0.996\ 8, n=8$),安石榴苷 B: $y=413.95x-12\ 127.42$ ($r=0.997\ 8, n=8$);鞣花酸: $y=1\ 112.91x-18\ 658.51$ ($r=0.999\ 4, n=8$)。结果表明,没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸的进样量分别在 0.020~0.320、0.038~0.608、0.074~1.184、0.039~0.624 μg 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取各对照品溶液适量,连续进样 5 次,每次 10 μl,按上述色谱条件测定。结果,没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸峰面积的 RSD 分别为 1.36%、1.51%、1.58% 和 0.91% (n 均为 5),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,按上述色谱条件分别于 0、3、6、9、16 h 进样 10 μl 测定。结果,没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸平均含量的 RSD 分别为 2.45%、1.92%、2.96% 和 0.72% (n 均为 5),表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取石榴皮粉末适量,共 6 份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定。结果,没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸平均含量的 RSD 分别为 2.14%、2.52%、2.32% 和 1.97% (n 均为 6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取石榴皮粉末 0.50 g (含没食子酸 0.215 mg/g、石榴皮鞣素 2.70 mg/g、安石榴苷 100.55 mg/g、鞣花酸 4.11 mg/g), 共 12 份, 其中 6 份分别精密加入质量浓度为 400 $\mu\text{g/ml}$ 的没食子酸对照品溶液 0.28 ml, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 用于测定没食子酸的加样回收率; 另外 6 份分别精密加入 1.35 mg 石榴皮鞣素、50 mg 安石榴苷对照品和质量浓度为 390 $\mu\text{g/ml}$ 的鞣花酸对照品溶液 5 ml, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 用于测定石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸的加样回收率。结果, 没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸的平均加样回收率分别为 93.22%、95.35%、98.00% 和 99.84%, RSD 分别为 2.75%、2.28%、2.11% 和 1.82% (n 均为 6)。

2.9 样品含量测定

取 3 批样品, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 以外标法定量。结果, 3 批样品中每 1 g 平均分别含没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸 0.212、2.70、100.35、4.14 mg (n 均为 3)。

3 讨论

多酚类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, 相对于其他多酚类成分, 鞣花酸的药理学、提取和检测方法的研究报道较多^[8-11]。Jimenez Del Rio M 等^[9]通过研究认为, 安石榴苷是石榴皮多酚类成分的主体, 其含量远高于鞣花酸和石榴皮鞣素, 因此应该用安石榴苷和鞣花酸的含量来共同评价石榴皮提取物的质量。本试验结果表明, 石榴皮中安石榴苷含量最高, 鞣花酸次之, 石榴皮鞣素含量较低, 没食子酸含量最低, 这与 Jimenez Del Rio M 等的研究结果有一致之处。另外, 本试验所测得安石榴苷的含量与文献^[9]报道的干燥石榴皮中含有 10% 左右的安石榴苷不谋而合。目前, 国内、外研究者虽然对石榴皮中石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸都建立了相应的定量检测方法, 笔者也曾建立石榴皮提取物中多种鞣质成分含量的测定方法^[6], 但是尚未见到同时检测石榴皮药材中多种多酚类成分的报道。由于产地不同会导致石榴皮的质量差别很大^[7], 因此笔者建立的同时检测石榴皮中没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸的定量方法对于全面评价石榴皮的质量具有实践意义。

提取方法的选择对石榴皮中各成分的定量是否准确存在直接关系, 笔者曾用单一溶剂提取石榴皮中的多酚类成分, 经过反复比较, 其提取效率均不如多种溶剂混合提取。另外, 料液比是提取效率的一个重要参数, 取 1 g 石榴皮粉末分别用 20、40、60、80、100 ml 混合溶剂提取, 经过足够长时间的超声提取之后发现用 80 ml 混合溶剂提取的效率与 60 ml 混合溶剂比较无显著差异, 但为了更加充分、准确地对样品中待测成分进行提取, 故选择 100 ml 混合溶剂。

检测波长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 4 种成分中, 没食子酸、安石榴苷和石榴皮鞣素具有非常相似的性质, 而安石榴苷由一对同分异构体(A、B)组成, 这些特点都给本检测方法的建立带来了挑战。参考文献^[8-10]中的 HPLC 条件, 发现在 377 nm 波长下石榴皮鞣素、

安石榴苷和鞣花酸均有较强吸收峰, 且无干扰物质出现, 因此选用在 377 nm 波长下检测石榴皮鞣素、安石榴苷和鞣花酸。而没食子酸在 377 nm 波长下没有吸收, 故对其采取特殊的前处理, 经过醋酸乙酯萃取以后使其在 254 nm 波长下能很好的与其他杂质分开且回收率可达到试验要求。

在本检测方法下, 安石榴苷的一对同分异构体(A、B)呈现双峰。采用硼氢化钠还原的方法可将双峰变换为一个新的单峰进行检测, 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。岛津 LC-20AB HPLC 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一条标准曲线, 故本试验将安石榴苷的 2 个同分异构体单独绘制标准曲线(将安石榴苷的 2 个同分异构体看作 2 种独立的物质, 按 2 个峰的峰面积之比将所进样中安石榴苷的量分成 2 份分别作标准曲线), 所得标准曲线较精确, 符合试验要求。

参考文献

- [1] Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review[J]. *Altern Med Rev*, 2008, 13(2):128.
- [2] Li Yunfeng, Guo Changjiang, Yang Jijun, et al. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract[J]. *Food Chem*, 2006, 99(1):254.
- [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]. *Georgian Med News*, 2006, 140:70.
- [6] 刘振平, 陈祥贵, 杨潇, 等. RP-HPLC 法同时测定石榴皮提取物中的 3 种鞣质成分[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(19):2645.
- [7] 周本宏, 吴玥, 王慧媛, 等. 石榴皮药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. *中国药房*, 2008, 19(30):2351.
- [8] 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.
- [9] Zhou Honghao, Lv Jiao, Yuan Qipeng. Preparative isolation and purification of punicalin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography[J]. *SEP PURIF TECHNOL*, 2010, 72:228.
- [10] Lu J, Wei Y, Yuan Q. Preparative separation of punicalin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 857(1):175.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-03-27)