

RP-HPLC 法同时测定石榴皮提取物阴道泡腾片中安石榴苷和鞣花酸

罗玉琴, 李 洋, 热依木古丽·阿布都拉, 刘 力, 阿吉艾克拜尔·艾萨*

中国科学院新疆理化技术研究所 干旱区植物资源化学重点实验室, 新疆特有药用资源利用省部共建实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 法同时测定石榴皮提取物阴道泡腾片中安石榴苷和鞣花酸的方法。方法 色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.2%三氟乙酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min, 检测波长 280 nm。结果 安石榴苷在 0.098~0.610 mg/mL ($r=0.9991$)、鞣花酸在 0.011~0.060 mg/mL ($r=0.9998$) 有良好的线性关系; 平均回收率分别为 102.0%、100.4% ($n=9$), RSD 均小于 1.5%。结论 本方法简便、准确、专属性强, 为石榴皮提取物阴道泡腾片的质量控制建立了方法。

关键词: 石榴皮提取物; 阴道泡腾片; 安石榴苷; 鞣花酸; RP-HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2011-03

Determination of punicalagin and ellagic acid in Vaginal Effervescent Tablets of *Punica granatum* peel extracts by RP-HPLC

LUO Yu-qin, LI Yang, ABDULLA Rahimagul, LIU Li, AISA Hajiakber

State Key Laboratory of Xinjiang Medicinal Plants Resource Utilization, Key Laboratory of Chemistry of Plant Resources in Arid Regions, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

Key words: the extracts from peel of *Punica granatum* L.; Vaginal Effervescent Tablets; punicalagin; ellagic acid; RP-HPLC

石榴皮是石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮, 为我国传统药材。国内外学者研究表明, 石榴皮中的多酚类成分具有很好的抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒等药理活性^[1-5], 并对石榴皮中鞣质类成分安石榴苷进行研究^[6]。安石榴苷以 α -、 β -安石榴苷同分异构体存在, 本课题组依据 HPLC-MS 及 NMR 进行分析, 其结果与文献报道一致^[7-8]。以石榴皮多酚提取物为原料制成外用阴道泡腾片, 经体内药效学研究表明具有较好的抗炎、止痒以及治疗霉菌性阴道炎作用, 其中安石榴苷和鞣花酸是主要活性成分。为了有效控制制剂质量, 本实验采用 RP-HPLC 法同时测定泡腾片中主要活性成分安石榴苷 (α -、 β -安石榴苷的总量) 和鞣花酸的量。方法学考察结果表明, 该方法简便、准确、专属性强, 可作为石榴皮提取物阴道泡腾片的质量控制依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 液相色谱仪, 含 G1311A 四元泵、G1379A 在线脱气机、G1313A 自动进样器、G1316 柱温箱和 G1314A VWD (美国 Agilent 公司); Buchi R-210 型旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司); SZ-93 自动双重纯水蒸馏仪 (上海亚荣生化仪器厂); ESJ180-4 型电子天平 (沈阳龙腾电子有限公司); KQ2200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

鞣花酸对照品 (质量分数 $\geq 98\%$, 美国 Sigma 公司), 安石榴苷对照品 (HPLC 测定 α -、 β -安石榴苷质量分数之和 $\geq 98\%$, 成都曼思特生物科技有限公司); 石榴皮提取物阴道泡腾片 (自制, 0.5 g/片, 批号 100110、100310、100312) 及阴性对照品 (自制); 甲醇、乙腈为色谱纯; 三氟乙酸为分析纯; 实验室用水为超纯水。

收稿日期: 2010-12-31

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-XB2-17); 中国科学院创新团队国际合作伙伴计划资助 (2010 年)

作者简介: 罗玉琴 (1974—), 女, 湖南省湘乡市人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为新药、民族药的研究。

Tel: (0991)3836733 Fax: (0991)3838957 E-mail: Luoyq3106@sohu.com

*通讯作者 阿吉艾克拜尔·艾萨 Tel: (0991)3835679 Fax: (0991)3838957 E-mail: Haji@ms.xjb.ac.cn

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A)-乙腈 (B)-0.2% 三氟乙酸水溶液 (C), 梯度洗脱: 0~10 min, 2%~3% A, 2%~8% B; 10~20 min, 3%~4% A, 8%~12% B; 20~40 min, 4%~20% A, 12%~20% B; 检测波长 280 nm; 柱温 30 °C; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 5 μL, 理论塔板数不低于 5 000。

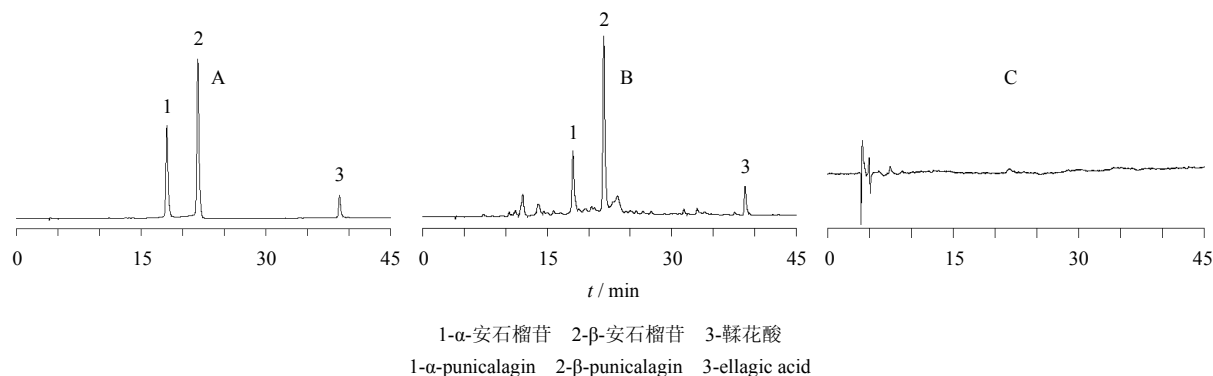


图 1 混合对照品 (A)、石榴皮提取物阴道泡腾片 (B) 和阴性对照 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Vaginal Effervescent Tablets of *P. granatum* peel extracts (B), and negative sample (C)

2.3 供试品溶液的制备

取石榴皮提取物阴道泡腾片适量, 研细。精密称取本品约 0.10 g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 密塞, 超声 (功率 100 W, 频率 40 kHz) 处理 5 min, 放冷, 滤过, 残渣用适量的甲醇洗涤, 合并滤液和洗涤液, 旋转蒸干, 然后用甲醇定容至 25 mL 棕色量瓶中, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系考察

取安石榴苷和鞣花酸对照品, 分别配制含安石榴苷 0.610、0.488、0.366、0.317、0.183、0.098 mg/mL, 鞣花酸 0.060、0.045、0.038、0.030、0.021、0.011 mg/mL 的混合对照品溶液, 按上述色谱条件, 分别进样 5 μL, 以进样质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: 安石榴苷 $Y=10\,327 X-348.39$, $r=0.999\,1$, 鞣花酸 $Y=9\,818.8 X-18.341$, $r=0.999\,8$, 表明安石榴苷在 0.098~0.610 mg/mL, 鞣花酸在 0.011~0.060 mg/mL 线性关系良好。

2.5 精密度试验

取样品 (批号 100110), 按“2.2”项下操作, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 5 次, 计算得安石

榴苷和鞣花酸与样品甲醇提取液的其他组分达到基线分离; 经阴性对照试验, 结果阴性对照无干扰, 证明此色谱条件可行。见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取安石榴苷对照品 30 mg, 加甲醇制成 3 mg/mL 的对照品储备液; 精密称取鞣花酸对照品 3 mg, 加甲醇制成 0.3 mg/mL 的对照品储备液。均避光低温保存, 临用新配。

榴苷和鞣花酸峰面积的 RSD 分别为 1.17%、1.23%。

2.6 稳定性试验

取样品 (批号 100110), 按“2.2”项下操作, 按“2.1”项下色谱条件, 每隔 1 h 进样 1 次, 测定安石榴苷和鞣花酸的峰面积, 考察其稳定性。结果表明, 安石榴苷和鞣花酸在 4 h 内稳定性良好, RSD 分别为 1.35%、1.26%, 4 h 之后安石榴苷的量下降。

2.7 重现性试验

取样品 (批号 100110) 5 份, 分别研细, 各取约 0.1 g, 精密称定, 按“2.2”项下操作, 按“2.1”项下色谱条件, 分别测定, 计算得安石榴苷、鞣花酸质量分数的 RSD 分别为 1.00%、1.78%。

2.8 回收率试验

取批号 100110 的样品 9 份, 每份 0.05 g, 精密称定, 按低、中、高质量浓度分为 3 组, 每组 3 份, 分别精密加入 3.25 mg/mL 安石榴苷对照品溶液 0.6、0.8、1.0 mL, 0.283 mg/mL 鞣花酸对照品溶液 0.6、0.8、1.0 mL, 按“2.2”项下操作, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算得安石榴苷和鞣花酸的平均回收率分别为 102.0%、100.4%, RSD 分别为 1.12%、1.22%。

2.9 样品测定

取石榴皮提取物阴道泡腾片(0.5 g/片)3批,每批3份,制备供试品溶液,按照上述测定方法进行测定,按回归方程计算方法计算3批样品中安石榴苷、鞣花酸的质量分数,结果见表1。

表1 石榴皮提取物阴道泡腾片中安石榴苷和鞣花酸测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of punicalagin and ellagic acid in Vaginal Effervescent Tablets of *P. granatum* peel extracts ($n=3$)

批号	安石榴苷/(mg·片 ⁻¹)	鞣花酸/(mg·片 ⁻¹)
100110	19.65	3.76
100310	20.1	3.83
100312	19.9	3.79

3 讨论

3.1 检测波长的选择

分别对一定质量浓度的安石榴苷、鞣花酸对照品溶液和供试品溶液在190~700 nm波长内进行全扫描,安石榴苷和鞣花酸均在258 nm处有最大吸收。参照文献报道^[6]和试验中的色谱图的具体情况,选择280 nm进行测定,在此波长处无杂质峰干扰。

3.2 流动相的选择

在流动相的选择上,分别尝试甲醇-0.3% H₃PO₄水溶液、乙腈-水(pH 3.2)、乙腈-水(0.1%三氟乙酸)、甲醇-乙腈-水(0.1%三氟乙酸)、甲醇-乙腈-水(0.06%三氟乙酸)、甲醇-乙腈-水(0.2%三氟乙酸)等流动相体系,发现采用甲醇-乙腈-水(0.2%三氟乙酸)流动相系统时在色谱峰的数量、分离度和峰形方面比较符合分析要求,因此选择此流动相进行测定。

3.3 提取溶剂的选择

以安石榴苷和鞣花酸单位质量对应的峰面积为指标,采用单因素试验法对提取溶剂进行考察。分

别采用甲醇、70%甲醇、50%甲醇和水作为提取溶剂,结果对于相同质量的样品,水作为溶剂时安石榴苷的提取率最高,甲醇作为溶剂时鞣花酸的提取率最高,为了提高分析的准确性,同时考虑安石榴苷在水溶液中的不稳定性,故选用甲醇作为样品的提取溶剂。

本实验建立的RP-HPLC同时测定石榴皮提取物阴道泡腾片中安石榴苷和鞣花酸含量的方法,灵敏度高,重复性和稳定性均良好,测定迅速,结果准确,可用于制剂的质量控制。

参考文献

- [1] Singh R P, Chidambara Murthy K N, Jayaprakasha G K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(1): 81-86.
- [2] Negi P S, Jayaprakasha G K, Jena B S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts [J]. *Food Chem*, 2003, 80(3): 393-397.
- [3] Ajaikumar K B, Asheef M, Babu B H, et al. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96(1/2): 171-176.
- [4] Prashanth D, Asha M K, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum* [J]. *Fitoterapia*, 2001, 72(2): 171-173.
- [5] 张杰, 詹炳炎, 姚学军, 等. 石榴皮对乙型肝炎病毒(HBV)的体外灭活作用及其临床意义 [J]. *中药药理与临床*, 1997, 13(4): 29-31.
- [6] 李海霞, 张红岭, 刘延泽, 等. RP-HPLC法测定石榴皮中安石榴苷 [J]. *中草药*, 2006, 37(5): 780-782.
- [7] Martin K R, Krueger C G, Rodriguez G, et al. Development of a novel pomegranate standard and new method for the quantitative measurement of pomegranate polyphenols [J]. *J Sci Food Agric*, 2009, 89(1): 157-162.
- [8] Lu J J, Ding K, Yuan Q P, et al. Determination of punicalagin isomers in *Pomegranate Husk* [J]. *Chromatographia*, 2008, 68(3/4): 303-306.