

## 实验技术与方法

## 高效液相色谱法同时测定保健食品中的安石榴甙和鞣花酸

赵海燕,杨永红,刘泰然,陈忠辉,罗仁才

(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

**摘要:**目的 建立同时测定保健食品中安石榴甙、鞣花酸的高效液相色谱法(HPLC)方法。方法 采用迪马 钻石 II (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,乙腈 + 0.2% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱,在波长 256 nm 下进行检测。结果 方法的线性范围:α 安石榴甙 24 ~ 240 μg/ml;β 安石榴甙 56.0 ~ 560 μg/ml;鞣花酸 60.0 ~ 600 μg/ml。相关系数  $r$  为 0.999 7 ~ 0.999 9;检出限:α 安石榴甙、β 安石榴甙、鞣花酸分别为 2.36、2.78、2.67 μg/g;定量限:7.08、8.34、8.01 μg/g。高低两个浓度水平加标回收率 97.5% ~ 104%;相对标准偏差(RSD)均 < 2.5%。结论 本方法简便、快速、准确、重现性好,适用于保健食品中安石榴甙和鞣花酸的测定。

**关键词:**安石榴甙;鞣花酸;高效液相色谱法;保健食品;功效成分

中图分类号:O657.72 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)04-0333-03

## Simultaneous determination of ellagic acid and punicalagins in health food by HPLC

Zhao Haiyan, Yang Yonghong, Liu Tairan, Chen Zhonghui, Luo Rencai

(Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

**Abstract: Objective** To establish a method for the simultaneous determination of ellagic acid and punicalagins in health food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Chromatographic separation was carried out by using a Diamonsil C<sub>18</sub> (II) column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phases were acetonitrile and 0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aqueous solution with an optimized gradient elution. The detective wavelength was 256 nm. **Results** The detection limits of α ellagic acid, β ellagic acid and punicalagins were 2.36, 2.78 and 2.67 μg/g, respectively. The linear range for α ellagic acid, β ellagic acid and punicalagins were 24-240 μg/ml, 56.0-560 μg/ml and 60.0-600 μg/ml, respectively, and all of which showed a correlation coefficient of over 0.999 7. The recoveries of three analytes at two spiked levels were ranged from 97.5% -104% and all of the relative standard deviation (RSD) were less than 2.5%. **Conclusion** This method was validated to be simple, rapid, accurate and reproducible for the determination of Ellagic Acid and punicalagins in health food.

**Key words:** Ellagic acid; punicalagins; HPLC; functional foods; functional components

从石榴皮和石榴籽中提取的成分被用作保健食品原料,含有鞣花酸(ellagic acid),安石榴甙(punicalagins:α + βPunicalagin)和其他酚类化合物等。安石榴甙和鞣花酸是其中两个主要的有效成分,安石榴甙为鞣花酸聚合化合物,人体吸收后,降解形成鞣花酸。鞣花酸可用于防治结肠癌,食管癌、肝癌、肺癌、舌及皮肤肿瘤等病症。还可增强人体免疫功能,并起到降压、镇静功效。国内外已开发以其为原料的保健食品及药品。目前,鞣花酸的测定方法文献已有报道<sup>[1]</sup>,而安石榴甙的测定方法还未见报道。本文建立了 HPLC 同时测定石榴提取物中安石榴甙(α + β)和鞣花酸含量的方法,可用于石榴提取物及相关产品中的测定。

## 1 材料与方法

## 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪,配备有 Waters Allains2695 泵控及自动进样系统,以及 Waters 2996 二极管阵列检测器、离心机、超声震荡器。

乙腈、甲醇、磷酸(色谱纯);二甲基亚砷(分析纯);试验用水均为超纯水。破壁液:400 ml 二甲基亚砷 + 100 ml 10% 柠檬酸。

安石榴甙对照品购自同田生物公司(纯度 99%,α 安石榴甙 30%;β 安石榴甙 70%,批号 P100923);鞣花酸对照品购自 Sigma 公司(纯度 99%,批号 093k1374)。

对照品储备液的配制:分别精密称取安石榴甙、鞣花酸对照品 0.020 0 g 于两个 10.00 ml 容量瓶中,用甲醇溶解,并定容至刻度。α 安石榴甙浓度为 600 μg/ml;β 安石榴甙浓度为 1 400 μg/ml;鞣花

酸浓度为 2 000 μg/ml。

标准系列的配制:分别移取 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 ml安石榴甙储备液和 0.3、0.75、1.5、3.0 ml鞣花酸储备液于 10.00 ml 容量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度。α 安石榴甙的浓度为 24, 60, 120, 240 μg/ml;β 安石榴甙的浓度为 56, 140, 280, 560 μg/ml;鞣花酸的浓度为 60, 150, 300, 600 μg/ml。

### 1.2 液相色谱条件

色谱柱:迪马 钻石 II 4.6 mm × 250 mm, 5 μm;

流动相: A:0.2% 磷酸水溶液; B: 乙腈;

梯度洗脱:

	A	B
0 min	95	5
15 min	70	30
17 min	70	30
18 min	95	5

检测波长 256 nm; 流速 1.0 ml/min; 柱温 35 ℃。

### 1.3 样品前处理

准确称取石榴粉样品 0.20 ~ 2.00 g 于 50.0 ml 离心管中,加入 10 ml 破壁液及 10 ml 甲醇,超声提取 30 min 后冷却至室温,用甲醇定容至刻度,摇匀,再以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 μl 液相色谱仪测定。

### 1.4 定性及定量

分别取标准和样品各 10 μl 进样, HPLC 测定。以保留时间和扫描光谱图定性,外标法定量。

### 1.5 计算公式

$$C = \frac{c \times V}{1\ 000\ m}$$

式中 C:样品中待测组分的含量, mg/g;

c:样品中待测组分的测定浓度, μg/ml;

m:样品重量, g;

V:定容体积, ml;

1 000:单位转换, μg/g 变为 mg/g。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相中酸的选择

分别选择纯水和 0.05%、0.1%、0.2% 的磷酸作为流动相进行试验,在纯水时安石榴甙和鞣花酸峰型拖尾很严重,而且 α 安石榴甙和 β 安石榴甙无法完全分离;并且在色谱柱上保留强度比较弱,出峰时间过早,不能够与杂质分离。随着酸度的增加,当在 0.2% 磷酸为流动相时,有效地改善了 3 个组分的峰型,而且增强了组分的保留时间,更有效地与杂质分离开(图 1 和图 2)。

### 2.2 检测波长的选择

根据 3 种组分的紫外光谱图(见图 3),两种安

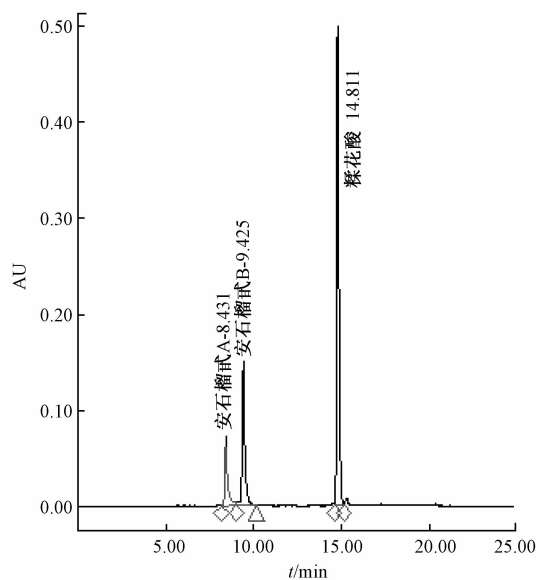


图 1 标准色谱图

Figure 1 The chromatogram of standards

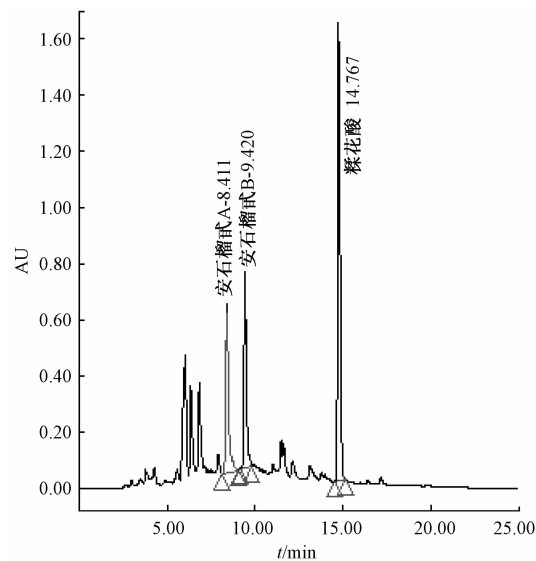


图 2 样品色谱图

Figure 2 The chromatogram of sample

石榴甙的最佳吸收波长均为 258.7 nm,而鞣花酸的最佳吸收波长为 254.0 nm,本文选择 256.0 nm 作为检测波长可以满足 3 种组分较高的灵敏度测定要求。

### 2.3 样品提取液的选择

3 种组分均极易溶于甲醇,而破壁液具有极强渗透性,可以更有效地提取出组分,实验证明加入破壁液可使提取效率提高 40%。选择加入不同体积的破壁液进行试验,当加入 10.0 ml 破壁液时可以完全提取样品中的组分。

### 2.4 线性关系及检出限

3 种个组分在线性范围内与响应值呈良好的线性关系,其结果见表 1。

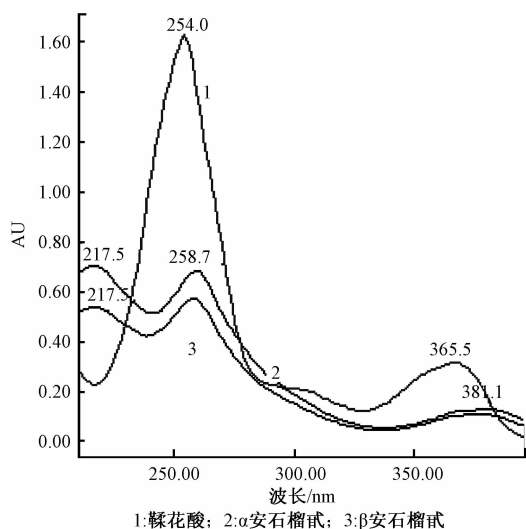


图3 3种组分的光谱图

Figure 3 The spectrogram of three components

表1 方法的线性范围、回归方程及检出限

Table 1 The linear range, regression equation and the limits of detection of the method

组分	线性范围 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	标准曲线	$r$	定性检 出限 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	定量检 出限 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
$\alpha$ 安石榴甙	24 ~ 240	$y = 7080x - 16800$	0.9999	2.36	7.08
$\beta$ 安石榴甙	56 ~ 560	$y = 6270x - 53800$	0.9997	2.78	8.34
鞣花酸	60 ~ 600	$y = 9900x - 102000$	0.9999	2.67	8.01

### 2.5 回收率试验

称取同类粉末空白样品 2.00 g 为本底做加标回收试验,其结果见表 2。

表2 加标回收实验

Table 2 The recovery of standard addition

组分	加标量 ( $\text{mg}/\text{g}$ )	测定值 ( $\text{mg}/\text{g}$ )	平均回收率 (%)
$\alpha$ 安石榴甙	1.00	1.04	104.0
	4.50	4.53	101.0
$\beta$ 安石榴甙	2.00	1.96	98.0
	9.00	9.02	100.0
鞣花酸	2.00	1.95	97.5
	9.00	8.87	98.6

### 2.6 精密度试验

对同一石榴粉样品取样 6 份。按 1.3 方法处理后进样测定,3 个组分的 RSD 分别为 1.8%、2.5%、1.9%。结果见表 3。

表3 方法精密度试验

Table 3 The precision of the method ( $n = 6$ )

组分	测定结果( $\text{mg}/\text{g}$ )	RSD(%)
$\alpha$ 安石榴甙	35.9、35.8、34.9、35.9、34.7、34.5	1.8
$\beta$ 安石榴甙	42.7、43.7、41.6、43.6、42.4、41.1	2.5
鞣花酸	41.6、42.3、40.6、41.3、40.1、40.7	1.9

### 2.7 实际样品的测定

对同一样品 3 个批次进行试验,其结果见表 4。

表4 样品测定结果

Table 4 The detected results of samples ( $\text{mg}/\text{g}$ )

样品批次	$\alpha$ 安石榴甙	$\beta$ 安石榴甙	鞣花酸
20110613	35.0	41.8	41.6
20110615	35.7	40.3	41.7
20110617	34.9	40.2	41.3

### 3 结论

经方法学研究及实际样品测定结果表明,本文所建方法简便易行、快速、准确,而且重现性很好。可以用于石榴提取物及相关产品中安石榴甙( $\alpha + \beta$ )和鞣花酸的测定。

### 参考文献

- [1] 李鸿飞,陈蕾,李明,等. 石榴皮中鞣花酸的测定[J]. 新疆中医药, 2008,26(6):43.
- [2] 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含量[J]. 广东药学院学报, 2005,21(6):693-694.
- [3] 李小萍,梁琪,辛秀兰,等. 高效液相色谱法测定红树莓中鞣花酸含量[J]. 安徽农业科学, 2009,37(24):11345-11346.
- [4] 贝玉祥,杨阳,郭英,等. 高效液相色谱法测定河子中鞣花酸的含量[J]. 时珍国医国药,2009,20(9):2178-2179
- [5] 刘艳,宋立秋,范俊娟,等. HPLC 法测定蓝莓中鞣花酸含量[J]. 江苏农业科学, 2008,3:217-219.
- [6] 袁永兵,张兰珍,郭亚健,等. RP-HPLC 法测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2009,32(1):56-58
- [7] 王子祺,斯建勇,刘新民,等. 蛇莓中鞣花酸和短叶苏木酚鞣酸的分离鉴定及含量测定[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(4):667-671.
- [8] 曲文娟,张渭洁,徐敏瑶,等. 高效液相色谱测定石榴皮水提取物中 4 种多酚化合物的含量[J]. 分析测试学报,2011,30(12):1425-1429.
- [9] 刘玉革,王松标,刘胜辉,等. 高效液相色谱法测定芒果果皮中游离鞣花酸含量[J]. 广东农业科学, 2011(18):128-129.