

水质对石榴皮中安石榴苷提取纯化工艺的影响

郑 欣, 常占瑛, 聂昌宏, 阿依居来克·卡得尔, 高晓黎*

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 考察水质对石榴皮安石榴苷提取纯化工艺的影响。**方法** 分别用生活饮用水和纯化水对石榴皮粉末中的安石榴苷进行提取分离纯化, 安石榴苷含量用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行测定。**结果** 生活饮用水对石榴皮粉末提取纯化得到安石榴苷含量为 2.65%; 纯化水对石榴皮粉末提取纯化得到安石榴苷含量为 78.79%。**结论** 生活饮用水对石榴皮安石榴苷提取纯化的影响极大, 会加速安石榴苷的氧化。

关键词: 生活饮用水; 纯化水; 安石榴苷; 高效液相色谱法

Effect of water quality on the extraction and purification of punicalagin from pomegranate peel

ZHENG Xin, CHANG Zhan-Ying, NIE Chang-Hong, AYIJULAIKE Ka-De-Er, GAO Xiao-Li*

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of water quality on extraction and purification of punicalagin from pomegranate peel. **Methods** Punicalagin from pomegranate peel powder were separated and purified by drinking water and purified water, respectively. The punicalagin content was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The content of punicalagin extracted and purified by drinking water was 2.65%. The content of punicalagin extracted and purified by purified water was 78.79%. **Conclusion** Drinking water has a great influence on the extraction and purification of pomegranate, and it will accelerate the oxidation of punicalagin.

KEY WORDS: tap-water; purified water; punicalagin; high performance liquid chromatography

1 引言

石榴皮为石榴科植物石榴(*Punica granatum* L.)的干燥果皮, 在我国传统医药中主要用于久泻、出血、蛔虫等症; 石榴的根、花、叶子、果实、种子以及果皮均可以入药并有很高的实用价值^[1]。石榴皮多酚是一类具强抗氧化活性和多种生物活性的多酚类物质又称石榴皮多酚, 主要用于预防和治疗多种疾病, 如炎症^[2]、糖尿病^[3]、腹泻、痢疾、肿瘤^[4]、疟疾以及肠道感染^[5,6]、心脑血管疾病^[7]等。

石榴皮多酚中的安石榴苷具有较多的酚羟基, 特别是邻位的酚羟基结构易被氧化, 其邻位的酚羟基结构可与多种金属离子络合。因此, 在制备石榴皮多酚提取物时工艺用水成为了关键物料。

水是药物在生产中使用量最大、使用最为广泛的一种原料。《中国药典》(2015 版二部)^[8]中所收录的制药用水, 因使用范围的不同分为 3 类: 纯化水、注射用水以及灭菌注射用水。在《中国药典》(2015 版一部)^[9]中提到饮用水可作为药材净制的漂洗、制药用具的粗洗用水, 除另有规

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发项目(2016B03044-1)

Fund: Supported by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Key Research and Development Project (2016B03044-1)

*通讯作者: 高晓黎, 教授, 博士, 主要研究方向为给药系统研究与新药研发。E-mail: xli_g@sina.com

*Corresponding author: GAO Xiao-Li, Professor, Ph.D, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: xli_g@sina.com

定外也可作为药材的提取溶剂。纯化水在《中国药典》中规定为饮用水经蒸馏法、反渗透法或者其他适宜的方法所制得的制药用水,不含任何添加剂^[10];其质量(如电导率、易氧化物以及重金属等)均须符合药典规定。

生活饮用水与纯化水最主要的区别就是制备的方式以及水的质量。生活饮用水与纯化水的主要水质区别见表1^[11]。

表1 生活饮用水与纯化水的主要水质区别
Table 1 The main water quality difference between tap water and purified water

	生活饮用水	纯化水
电阻率(25℃)		$\geq 10 \times 10^4 \Omega \text{cm}$
锰(Mn)含量	0.1 mg/L	$\leq 0.00001\%$
铁(Fe)含量	0.3 mg/L	$\leq 0.0004\%$
铜(Cu)含量	1.0 mg/L	
锌(Zn)含量	1.0 mg/L	
阴离子合成洗涤剂	0.3 mg/L	
氯化物	250 mg/L	$\leq 0.0005\%$
硫酸盐	250 mg/L	

本实验选择石榴皮安石榴苷提取物研究对象,研究不同水质对石榴皮安石榴苷提取物在提取纯化过程中的影响,以期为后续中药石榴皮多酚的开发提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent-1220LC 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); AB135-S 型分析天平(瑞士梅特勒公司); FW177 型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器有限公司); N-101 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); SHB-IIIS 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); PB-10 pH 计(北京赛多利斯公司)。

安石榴苷对照品(批号 MUST-16032501,纯度>98%,成都曼思特生物科技有限公司)。

95%乙醇(食用酒精);三氟乙酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);甲醇(色谱纯,美国西格玛公司);其他试剂为纯化水;生活饮用水(新疆医科大学中心实验室配备);纯化水(Milli-Q 纯水仪制备)。

石榴皮购自和田麦迪森维药有限公司,经新疆医科大学药学院帕丽达·阿不力孜教授鉴定为石榴科石榴属(*Punica granatum* L.)成熟果实干燥的皮,自然晾干,粉碎成粗粉,过80目筛,备用;HPD500大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 对照品溶液配制

精密称取6.40 mg安石榴苷标准品于10 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶液配制成0.640 mg/mL的标准储备液。

2.2.2 样品溶液配制

分别采用生活饮用水和纯化水对石榴皮粉末在乙醇中室温浸提,纱布过滤,过滤液减压浓缩,浸提液分别用生活饮用水和纯化水稀释(稀释至含一定浓度的生药),用盐酸调pH值,摇晃混匀后用2层滤纸抽滤,得澄清上样液。HPD500大孔树脂装柱,以2 BV/h的流速上样,上样结束后静置12 h,分别依次以生活饮用水和纯化水、乙醇(分别以生活饮用水和纯化水配制)以4 BV/h的流速除杂,最终以一定流速加入乙醇洗脱,所得流分取适量移至10 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,过0.22 μm滤膜,备用。

2.2.3 液相色谱条件

根据课题组前期建立的质量标准,采用高效液相色谱法测定^[12]。色谱柱:Agilent SB-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为0.1%三氟乙酸:甲醇,梯度洗脱条件:0~10 min: 95%:5%; 10~25 min: 80%:20%; 25~35 min: 55%:45%; 35~40 min: 35%:65%;检测波长370 nm;流速:1 mL/min;进样量10 μL;柱温30℃。

2.2.4 样品测定

分别吸取对照品及供试样品溶液,按2.2.3项色谱条件测定,代入标准曲线计算样品中安石榴苷的含量。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的制备

用0.640 mg/mL的安石榴苷标准储备液,以倍量稀释法将溶液配制成320、160、80、40、20、10 μg/mL系列浓度,摇匀,用0.22 μm的微孔滤膜滤过。按上述色谱条件测定。得线性回归方程为 $Y=58080.09157X-2041940.708$, $r^2=0.9990$;结果表明安石榴苷在40~640 μg/mL浓度范围内呈良好的线性关系。

3.2 精密度实验

取安石榴苷标准品溶液,按2.2.3项色谱条件测定,连续进样6次,计算安石榴苷标准品色谱峰峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.06%(n=6),结果表明,仪器精密度良好。

3.3 样品含量测定

根据2.2.2项下的方法制备样品溶液,按2.2.3项色谱条件进行测定,其色谱图如图1所示,与A图相比较,B图中安石榴苷色谱峰与标准品一致,杂质峰面积低;但C图中安石榴苷色谱峰与A图相差较大且杂质峰面积偏高;计算安石榴苷的含量,结果如表2所示,用生活饮用水提取

纯化所得安石榴苷的平均含量为 2.65%; 用纯化水提取纯化所得安石榴苷的平均含量为 78.79%。结果表明生活饮用水对石榴皮多酚提取纯化有着非常大的负面影响。

表 2 安石榴苷含量测定结果($n=3$)
Table 2 Results of punicalagin content ($n=3$)

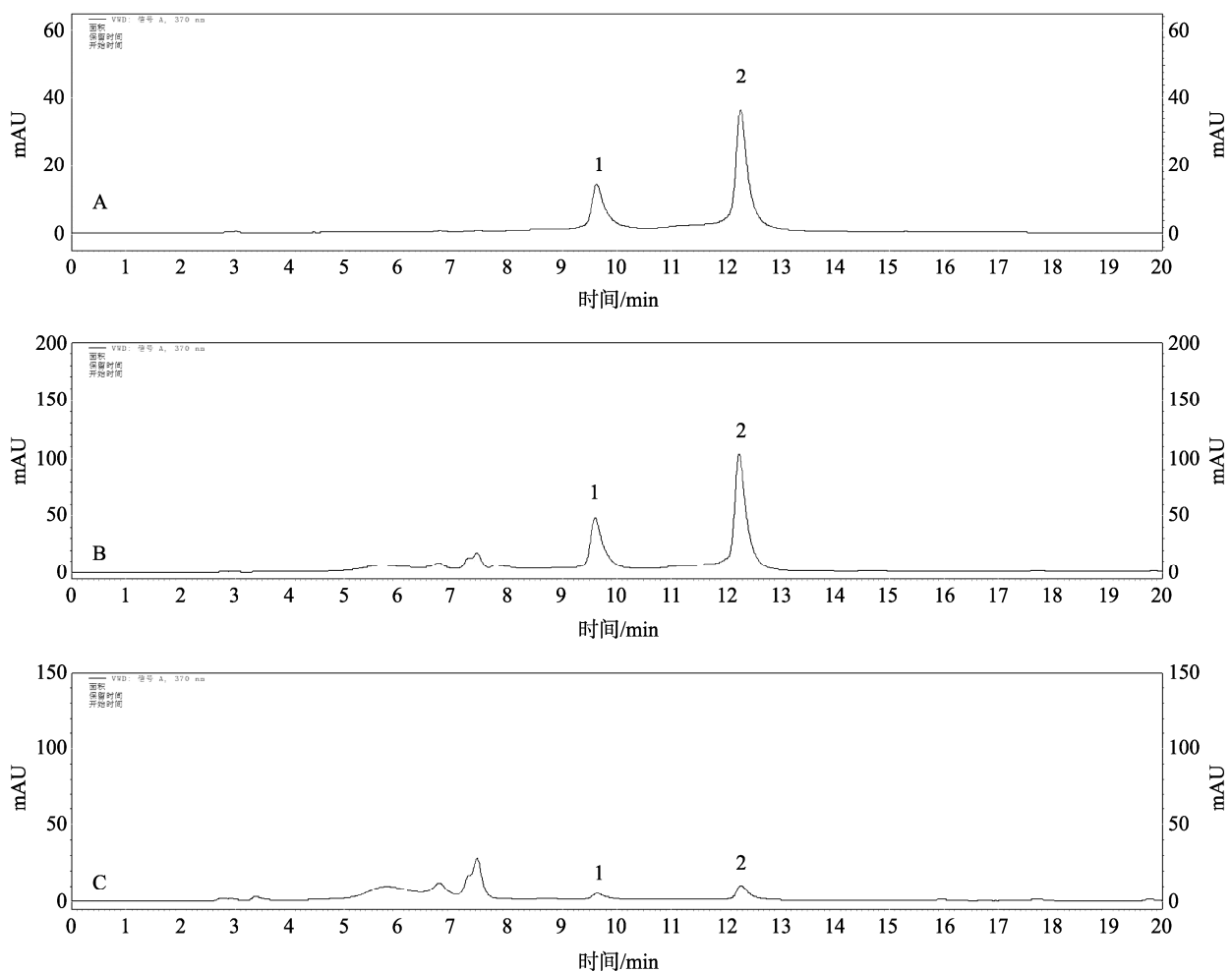
制备用水	安石榴苷含量/%	平均含量/%	相对标准偏差/%
纯化水	74.64	78.79	5.52
	75.14		
	86.60		
生活饮用水	0.70	2.65	1.59
	4.60		
	2.65		

4 结论与讨论

综观《中国药典》以及中药提取生产工艺的规定^[11], 生活饮用水是可以作为提取中药的溶剂。但在实验中发现,

当用生活饮用水作为中药材石榴皮多酚类物质的提取及纯化溶剂时, 纯化结果会存在很大的差异。本研究结果表明, 用纯化水提取纯化石榴皮药材所得安石榴苷的平均含量为 78.79%, 用生活饮用水提取纯化石榴皮药材所得安石榴苷的平均含量仅为 2.65%。

多酚类物质的结构中含有多羟基, 特点是邻位的酚羟基很容易被氧化; 饮用水中又存在这多种强氧化性的金属离子(如 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+})以及生活饮用水中加入的漂白粉(主要成分为次氯酸钙)等均易于石榴皮多酚类物质发生络合反应形成螯合物^[2,13], 导致石榴皮有效部位粉末中多酚类物质在提取纯化的过程中逐步被氧化。此外, 由于铁制自来水管的自身锈腐, 外加饮用水中加入的次氯酸、氯化物等对铁制水管的化学作用以及在净化处理时常加入氯化铁混凝剂, 导致生活饮用水中的 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 的含量要比天然水中的高, 增多了生活饮用水中的强氧化性物质, 大大加快了石榴皮多酚类物质在提取纯化过程中的氧化速度。导致用生活饮用水提取纯化石榴皮粉末的结果中未得到石榴皮多酚类物质。



注: A: 对照品; B: 纯化水制备样品; C: 生活饮用水制备样品; 1: α -安石榴苷; 2: β -安石榴苷。

图 1 安石榴苷色谱图

Fig.1 Chromatogram of punicalagin

针对一些药材用生活饮用水作为提取、纯化溶剂存在的差异,邵家德等^[14]研究发现当对苦参、牛蒡子、贝母、钩藤、木瓜、黄连、山楂、大黄、槐米等药材进行提取、煎煮、过滤、浓缩、离心之后,取上清液一份加入饮用水,另一份加入纯化水,观察发现加入饮用水的浓缩液产生絮状沉淀或块状沉淀;而加入纯化水的浓缩液,液体没有变化。说明饮用水中的某些成分与药材有效部位发生了反应。本课题组对生活饮用水及纯化水进行了电导率测定,结果发现生活饮用水的电导率有 $1300\text{ Ms}\cdot\text{cm}^{-1}$,约为纯化水的200多倍,由此可以推定,生活饮用水中含有较多的杂质,如金属离子、无机盐、漂白粉等多种成分。

用生活饮用水作为中药材有效部位提取纯化的溶剂,既可能影响成分的提取,也可能将水中浓缩后超负荷的有害物质带入到制剂中,不仅影响中药制剂的制备同时也影响着人类的生活健康。当放大工艺提取纯化石榴皮多酚类物质时首先应选用纯化水作为提取纯化溶剂;其次也应控制水中的易氧化物和氧化性强的金属离子,减少石榴皮多酚在制备过程中的氧化损失。所以在中药制剂生产制备过程中一定要注意水质的选择,并且要严格根据物质结构控制水的金属离子(如在中试生产提取纯化石榴皮多酚时一定要控制水中的 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 等)、次氯酸等易氧化物以及超标的有害物质等,防止在提取纯化过程中有效物质加速氧化。

参考文献

- [1] 冯立娟,尹燕雷,焦其庆,等.不同石榴品种果实酚类物质及抗氧化活性研究[J].核农学报,2015,30(4):710-718.
Feng LJ, Yin YL, Jiao QQ, et al. Study on phenolic compounds and antioxidant activity of different pomegranate varieties [J]. J Nuclear Agric, 2015, 30(4): 710-718.
- [2] 陈孝娟,顾政一,黄华,等.石榴皮总多酚抗菌消炎作用的初步研究[J].西北药学杂志,2011,26(4):268-270.
Chen XJ, Gu ZY, Huang H, et al. Preliminary study on antibacterial and anti-inflammatory effects of total polyphenols in pomegranate peel [J]. Northwest Pharm J, 2011, 26(4): 268-270.
- [3] 唐远谋,许丽佳,蒋卫东,等.石榴皮多酚对糖尿病小鼠肾脏抗氧化防御功能的影响[J].食品工业科技,2015,36(16):370-372.
Tang YM, Xu LJ, Jiang WD, et al. Effects of pomegranate peel polyphenols on antioxidant defense function in kidney of diabetic mice [J]. Food Sci Technol, 2015, 36(16): 370-372.
- [4] 王春梅,马桂芝,高晓黎,等.石榴皮多酚对人前列腺癌 PC-3 细胞增殖及凋亡的影响[J].西北药学杂志,2013,28(3):271-274.
Wang CM, Ma GZ, Gao XL, et al. Effects of pomegranate peel polyphenols on proliferation and apoptosis of human prostate cancer PC-3 cells [J]. Northwest Pharm J, 2013, 28(3): 271-274.
- [5] Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, et al. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum* L. (pomegranate) methanolic extract [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 96(1-2): 171-176.
- [6] 胡伟,代薇,杨宇梅,等.石榴皮对幽门螺杆菌的体外抑菌实验研究

[J]. 昆明医科大学学报,2006,27(4):25-27.

- Hu W, Dai W, Yang YM, et al. *In vitro* antibacterial activity of pomegranate peel on *Helicobacter pylori* [J]. J Kunming Med Univ, 2006, 27(4): 25-27.
- [7] 孙康悦,李颖,李悦琪,等.国内降血脂药物研究进展[J].西北药学杂志,2017,32(1):122-124.
Sun KY, Li Y, Li YQ, et al. Research progress in domestic lipid-lowering drugs [J]. Northwest Pharm J, 2017, 32(1): 122-124.
 - [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
 - [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典1部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (1) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
 - [10] 卫生部.生活饮用水卫生标准[J].经济管理文摘,2006,(11):36-38.
Ministry of Health. Sanitary standards for drinking water [J]. Econ Manag Digest, 2006, (11): 36-38
 - [11] 曹光明.中药浸提物生产工艺学[M].北京:化学工业出版社,2009.
Cao GM. Production technology of Chinese medicine extracts [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009.
 - [12] 丁楠.石榴皮多酚有效部位的制备工艺及质量标准的研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2012.
Ding N. Preparation technology and quality standard of effective parts of pomegranate peel polyphenol [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2012.
 - [13] 张国华,桑春燕.鞣质的鉴别方法[J].黑龙江科技信息,2009,(7):186.
Zhang GH, Sang CY. Identification method of tannin [J]. Heilongjiang Sci Technol Inform, 2009, (7): 186.
 - [14] 邵家德,孙蕾,周琴妹,等.对饮用水“可作为中药普通制剂所用药材的提取溶剂”之管见[J].中国中医药信息杂志,2006,13(4):39.
Shao JD, Sun L, Zhou QM, et al. Views on drinking water extraction solvent for medicinal materials used in common Chinese medicine preparations [J]. J Trad Chin Med Inform Sci, 2006, 13(4): 39

(责任编辑:陈雨薇)

作者简介



郑欣,硕士,主要研究方向为给药系统研究与新药研发。

E-mail: 565680181@qq.com

高晓黎,教授,博士,主要研究方向为给药系统研究与新药研发。

E-mail: xli_g@sina.com